

Aus dem medizinischen Zentrum für Hygiene und medizinische Mikrobiologie mit
Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. D. Klenk
Klinische Zytobiologie und Zytopathologie
Leiter: Prof. Dr. H. F. Kern

Untersuchung der Rolle des Tegumentproteins ppUL32 (pp150) bei der Reifung des humanen Zytomegalievirus durch stabile UL32- antisense-mRNA exprimierende Zelllinien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Horst Hemmo Meyer
aus Siegen

Marburg 1997

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 1. Juli 1997

Dekan: Prof. H. Schäfer
Referent: Prof. Dr. H. F. Kern
Koreferent: Prof. Dr. K. Radsak

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

- 1.1 Einführung und Taxonomie
- 1.2 Klinische Aspekte
- 1.3 Virusstruktur und Proteine
- 1.4 Replikation und Infektionszyklus
- 1.5 Morphogenese und Reifung
 - 1.5.1 Kapsidmorphogenese
 - 1.5.2 Transport- und Reifungsknospung
 - 1.5.3 Der Knospungs- und Sortierungs-Mechanismus
- 1.6 Zusammensetzung und Rolle des Teguments
- 1.7 Molekularbiologische Ansatzmöglichkeiten
- 1.8 Wirkung von antisense-mRNA
- 1.9 Fragestellung

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

2.2 Chemikalien und Enzyme

2.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

2.4 Verwendete Antikörper

2.5 Methoden zur Vermehrung von Plasmid-DNA

2.5.1 Bakterienstämme

2.5.2 Vermehrung und Langzeitlagerung der Bakterien

2.5.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

2.5.4 Transformation von E. coli

2.5.5 Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab

2.5.6 Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab

2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.6.1 Restriktionsspaltung

2.6.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA zur Analyse und Präparation

2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

2.6.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

2.6.5 Konversion 5'-überhängender Enden zu blunt-ends

2.6.6 Ligation

2.7 Herstellung der verwendeten DNA-Konstrukte

2.7.1 Verwendete Vektoren

2.7.2 Herstellung von UL32 sense- und antisense-Expressionskonstrukten für Inhibitionsexperimente

2.7.3 Herstellung eines UL32 Expressionskonstruktes mit dem gesamten Leserahmen für Lokalisationsexperimente

2.7.4 Herstellung eines Konstruktes zur in-vitro-Translation von UL32 RNA-Sonden

2.8 Zellkultur

2.8.1 Zellen

2.8.2 Medien und Lösungen

2.8.3 Kultivierung

2.9 Virus und Infektion

2.9.1 Virus-Stamm

2.9.2 Gewinnung eines infektiösen Virus-Stocks

2.9.3 Virus-Titer-Bestimmungen

2.9.4 Experimentelle HCMV-Infektion

2.10 Messung antiviraler Aktivität

2.10.1 Mikrotiter Assay zur Bestimmung antiviraler Faktoren

2.10.2 Untersuchung der Wirkung von Kultur-Überständen auf die HCMV- Replikation in U373MG

2.11 Transfektion und Selektion

2.12 Molekularbiologische Analyse-Verfahren

2.12.1 In vitro-Transkription und -Translation

2.12.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

2.12.3 Herstellung von radioaktiv markierten RNA- und DNA-Sonden

2.12.4 Qualitative und quantitative mRNA-Analyse durch Northern Blot- Hybridisierung

2.12.5 Quantifizierung von DNA durch Dot-Blot-Analyse

2.13 Proteinchemische und immunologische Verfahren

2.13.1 Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen und Fluorographie

2.13.2 Western-Blot-Analyse

2.13.3 Immunpräzipitation

2.14 Morphologische Methoden

2.14.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung

2.14.2 Elektronenmikroskopie

3 ERGEBNISSE

3.1	<u>Untersuchung der in vitro Expression von pp150 und seiner Lokalisation in transfizierten U373MG</u>
3.2	<u>Herstellung stabil UL32-antisense-mRNA exprimierender Zelllinien</u>
3.2.1	<u>Klonierung der UL32-antisense-mRNA Expressionsvektoren</u>
3.2.2	<u>Transfektion und Selektion von U373MG</u>
3.2.3	<u>Identifizierung von UL32-mRNA exprimierenden Zellklonen</u>
3.3	<u>Standardisierung der HCMV-Infektion von U373MG</u>
3.4	<u>Untersuchung der viralen und der rekombinanten UL32 mRNAs in HCMV-infizierten Zelllinien</u>
3.4.1	<u>Untersuchung des Expressionsmuster der viralen und der rekombinanten UL32 mRNAs im Verlauf einer Infektion</u>
3.4.2	<u>Untersuchung der UL32 mRNA Expression mit strangspezifischen Sonden.</u>
3.4.3	<u>Gegenseitige Abhängigkeit der Gleichgewichtsmenge von viraler und antisense-UL32-mRNA</u>
3.5	<u>Untersuchung der viralen Proteinbiosynthese durch Immunpräzipitation</u>
3.5.1	<u>Einfluß der rekombinanten UL32 mRNA auf die Biosynthese von pp150</u>
3.5.2	<u>Vergleichende Quantifizierung der pp150-Synthese mit der viraler Referenz-Proteine</u>
3.5.3	<u>Die Hemmung der pp150-Synthese ist abhängig von der UL32- antisense-mRNA Expression</u>
3.6	<u>Die Replikation der viralen DNA wird nicht gehemmt</u>
3.7	<u>Der inhibitorische Effekt in UL32-antisense-Zellen wurde nicht durch lösliche antivirale Faktoren hervorgerufen</u>
3.7.1	<u>Messung der Sekretion antiviraler Faktoren im heterologen System</u>
3.7.2	<u>Wirkung der Kulturüberstände auf die HCMV-Replikation in U373MG</u>
3.8	<u>Untersuchung der Freisetzung infektiöser Virionen in UL32- antisense-mRNA exprimierenden Zellen</u>
3.9	<u>Ultrastrukturelle Untersuchung der HCMV-Infektion in Kontroll- und antisense-mRNA Zellen</u>
3.9.1	<u>Der zytopathische Effekt in UL32-antisense-mRNA Zellen ist nicht vermindert</u>
3.9.2	<u>Untersuchung der nukleären und zytoplasmatischen viralen Vorläuferpartikel</u>

4 DISKUSSION

5 ZUSAMMENFASSUNG

6 LITERATURVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
AS	antisense (in Gegenrichtung)
Blotto	fettfreies Magermilchpulver
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
Ci	Curie
CPE	Zytopathischer Effekt
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
Cys	Cystein
d	Tag(e)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
G3PDH	Glucose-3-phosphat-Dehydrogenase
gB	Glykoprotein B
gH	Glykoprotein H
Glu	Glutamin
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde(n)
H ₂ O	destilliertes Wasser
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HRP	Horseradish-peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSV	Herpes Simplex Virus
IE	immediate early (sehr früh)
IFN	Interferon
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mA	Milliampère
MAb	Monoklonaler Antikörper
MEM	Minimum essential medium
Met	Methionin
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex I
MIEP	major immediate early promoter/enhancer
MOI	multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
NC	Nitrozellulose-Filter
NIEP	Non-infectious enveloped particle (nicht-infektiöses umhülltes Partikel)
NP-40	Nonidet P-40
NTR	nicht-translatierte Region
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotide
ORF	Offener Leserahmen
p.i.	post infectionem (nach Infektion)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAP	shrimps alkaline phosphatase (Schrimps Alkalische Phosphatase)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Saline sodium citrate
TCA	Trichloressigsäure

TCID50	tissue culture infective dose 50 (Gewebekultur infektiöse Dosis 50)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheit(en)
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VSV	Vesikular-Stomatitis-Virus
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung und Taxonomie

Die Zytomegalieviren bilden eine Unterfamilie der Herpesviren. Herpesviren zeichnen sich durch eine gemeinsame Virion- und Genomstruktur aus. Sie besitzen ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom, ein ikosaedrisches Kapsid und werden durch eine Membran umhüllt. Das Genom aller Herpesviren wird im Kern der infizierten Zelle repliziert und transkribiert. Eine Herpesvirus-Infektion kann lytisch verlaufen, wobei der gesamte Infektionszyklus vollzogen wird und infektiöse Virionen freigesetzt werden. Sie kann jedoch auch latent verlaufen, wobei das Virusgenom in der infizierten Zelle persistiert und nur einzelne Gene exprimiert werden. Die Familie der Herpesviren wurden in drei Unterfamilien unterteilt: Alpha, Beta, und Gamma-Herpesviren (Roizman, 1993). Diese Klassifizierung beruht eher auf biologischen Eigenschaften wie Wirts- und Zellspezifität, dem Ort der Persistenz, der Dauer des Infektionszyklus und dem zytopathischen Effekt als auf Nukleotidsequenzhomologien. Die Alpha-Herpesviren, zu denen das Herpes Simplex Virus (HSV) gehört, zeichnen sich durch eine breite Wirtsspezifität aus. Ihr Replikationszyklus ist relativ kurz und führt zur schnellen Zerstörung der Wirtszelle. Das Virus persistiert in sensorischen Ganglien. Zu den Gamma-Herpesviren gehört das Epstein-Barr-Virus (EBV). Es besitzt eine enge Wirtsspezifität und weist eine Zellspezifität für lymphoide Zellen auf. Zytomegalieviren gehören zu den Beta-Herpesviren. Diese weisen eine enge Wirtsspezifität und einen langen Replikationszyklus auf. Infizierte Zellen zeigen einen ausgeprägten zyto- pathischen Effekt mit nukleären und zytoplasmatischen Einschlusskörpern, wobei Zelle und Kern stark vergrößert sind. Die Persistenz kann in mehreren Zelltypen etabliert werden. Zytomegalieviren bilden eine Gruppe von speziesspezifischen Viren, die bei Primaten, Nagern, Pferden u. a. vorkommen. Vom Humanen Zytomegalievirus (HCMV) konnten bisher eine Vielzahl von sich nur geringfügig unterscheidenden Stämmen isoliert werden, von denen AD169 und Towne am besten untersucht sind. Neben HCMV (Human Herpesvirus 5, HHV- 5) gehören noch HHV-6 und HHV-7 zu den Beta-Herpesviren.

1.2 Klinische Aspekte

Das humane Zytomegalievirus ist ein ubiquitäres pathogenes Herpesvirus. Auf die Primärinfektion folgt häufig eine persistierende oder eine erneute Infektion. Obwohl bei erneuter Infektion die Reaktivierung des latenten Virus überwiegt, kann aufgrund der Antigenitäts- Vielfalt von CMV auch eine Neuinfektion Auslöser sein (Roizman et al. 1993). Die Übertragung verläuft in zwei Richtungen: Zum einen vertikal (intrauterin), zum anderen horizontal (extrauterin) über Austausch von Körperflüssigkeiten. In der untersuchten Bevölkerung beträgt die durchschnittliche Durchseuchung weltweit 30 - 100% aller Erwachsenen. Bei gesunden, immunkompetenten Adulten verläuft die Infektion in der Regel subklinisch, bei Patienten mit nicht vollständig entwickeltem oder supprimiertem Immunsystem kann das Virus hingegen schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen (Alford & Britt, 1993). Vor allem Virusreaktivierung und verstärkte Primärinfektion führen zu erhöhter Morbidität und Mortalität (Ho, 1982). Bei Organtransplantatpatienten, vor allem bei Nieren- (Klof, 1983) und Knochenmarkstransplantationen (Rubin et al., 1979) ist die

HCMV-Infektion eine der häufigsten Komplikationen. Das Virus besitzt zudem große Bedeutung als opportunistischer Erreger bei HIV-I-Patienten, bei denen die durch ihn verursachte Pneumonie die häufigste unmittelbare Todesursache darstellt (Macher et al., 1983). Zahlreiche Beobachtungen weisen zudem auf kausale Beziehungen zwischen HCMV-Infektionen und frühzeitige Arteriosklerose bzw. Krebserkrankungen hin (Giraldo et al., 1980; Roche et al., 1981). Bei nichtadulten Infizierten wird zwischen prä- und postnataler Infektion unterschieden. In den USA sind unter den Lebendgeburten 0,2 - 2,2 % pränatal (intrauterin) infiziert worden. Von ihnen haben 5 % leichte, sich klinisch nur gering manifestierende und sich völlig zurückbildende Symptome (z. B. Hepatosplenomegalie), während weitere 5 % das Krankheitsbild "cytomegalic inclusion disease" (CID) in einer schweren Form ausbilden. Gekennzeichnet ist dieses Leiden durch charakteristische Zellvergrößerung mit intranukleären Inklusionen. Das Vorkommen dieser zytomegalischen Zellen ist bei schwerem Krankheitsbild disseminiert und sowohl in Speicheldrüsen als auch in Leber, Nieren und Lungen nachweisbar. Eine Beteiligung des Zentralnervensystems mit schweren Augen-, Ohr- und Hirnfehlbildungen wie Mikrozephalie tritt häufig hinzu. Bei diesen besonders schweren Formen eines solchen kongenitalen Zytomegaliesyndroms mit multiplen Organdefekten des Säuglings, das auf eine Primärinfektion der Mutter zurückzuführen ist, sterben 20 - 30 % der Kinder bereits im ersten Lebensjahr. Das HCMV vermehrt sich in vitro besonders gut in humanen Fibroblasten, in vivo dagegen infiziert es hauptsächlich duktale Epithelzellen. So sind bei Kleinkindern überwiegend die Speicheldrüsen betroffen. Eine schwere generalisierte HCMV-Infektion betrifft beim Erwachsenen wie beim infizierten Neugeborenen fast alle Organe: Neben den Speicheldrüsen vor allem Leber, Niere, die Lunge und bei Feten auch das Gehirn (Ho, 1982).

1.3 Virusstruktur und Proteine

Abbildung 1.1: Struktur des humanen Zytomegalievirus (HCMV). Links eine elektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 210.000x) nach Freisetzung aus einer Zelle, rechts digitales räumliches Modell eines Virions. gp: Glykoprotein, env: envelope (Membranhülle), teg: Tegument, nuc: Nukleokapsid, DNA: DNA-Kern

Das Zytomegalievirus hat eine für Herpesviren typische Virionstruktur (Abbildung 1.1). Das ikosaedrische Kapsid ist aus 162 Kapsomeren zusammengesetzt und hat einen Durchmesser von 100 nm. Den elektronendichten Kern des Kapsids bildet die spindelförmig kondensierte DNA. Das nukleinsäurehaltige Kapsid wird auch als Nukleokapsid bezeichnet. Es wird von einer amorphen Phosphoproteinschicht umgeben, die als Matrix oder Tegument bezeichnet wird. Über die Organisation dieser Struktur ist wenig bekannt. Sie erscheint in elektronen- mikroskopischen Aufnahmen häufig unregelmäßig in Form und Größe. Die Hülle wird durch eine Membran gebildet, in die die viralen Glykoproteine inseriert sind. Der Gesamtdurchmesser des Virions beträgt 160 - 200 nm. Neben den infektiösen Virionen werden zwei defiziente Arten von viralen Partikeln im Überstand infizierter Zellen beobachtet (Irmieri & Gibson, 1983). Die einen werden als non-infectious enveloped particles (NIEPs) bezeichnet. Sie besitzen eine Struktur und Proteinzusammensetzung, die ähnlich der von Virionen ist. Sie enthalten jedoch keine DNA. Weiterhin können sog. dense bodies (DBs) beobachtet werden. DBs besitzen weder Kapsid noch DNA, sie bestehen aus einem unterschiedlich großen Aggregat von Tegumentproteinen, das wie das Virion von einer Membran umhüllt ist. HCMV besitzt mit 230 kbp das größte Genom der Herpesviren. Es besteht aus einem langen und einem kurzen nicht repetitiven Segment (UL bzw. US). Sie werden jeweils von invertierten repetitiven Abschnitten flankiert, die als b (TRL und IRL) bzw. c (TRS und IRS) bezeichnet werden. Außerdem befindet sich die sog. a Sequenz an beiden Enden des Genoms und in invertierter Orientierung zwischen UL und US. Die Größe und Zahl der a Sequenzen kann zwischen verschiedenen HCMV-Stämmen variieren. Die Segmente UL und US können in beiden Orientierungen zueinander stehen, so daß vier Isoformen gebildet werden, die zu gleichen Mengen in allen Populationen vorkommen. Aufgrund dieses komplexen Aufbaus und Arrangements wurde es in die Klasse E der Herpesviren-Genome eingeteilt. Das Genom des Laborstamms AD169 wurde vollständig sequenziert (Bankier et al., 1991a). Es enthält 208 offene Leserahmen (ORF), die für mehr als 100 Aminosäuren kodieren (Chee et al., 1990). Die Bezeichnung des Leserahmen enthält das Segment auf dem sie liegen und die Nummer, die sich nach der Reihenfolge ihres Auftretens auf dem jeweiligen Segment richtet. Nach der einheitlichen Nomenklatur (Landini & Spaete, 1993) werden Proteine mit der Leserahmen und einer näheren Charakterisierung des Proteins beschrieben. So bezeichnet gpUL55 ein Glyko- protein, das vom 55. Leserahmen auf Segment UL kodiert wird, und ppUL32 ein Phospho- protein, das ein Genprodukt des 32. Leserahmens darstellt. Bisher konnten jedoch nur einigen Leserahmen regulatorische bzw. strukturelle Proteine zugeordnet werden (Mocarski, 1993). Man schätzt, daß etwa 30

Proteine in der Größenordnung von ca. 11-212 kDa das infektiöse Virion bilden (Kim et al., 1976). Das Kapsid besteht hauptsächlich aus vier Proteinen (Baldick & Shenk, 1996): dem großen (pUL86, 150 kDa), dem kleinen (pUL46., 34 kDa) und dem kleinsten (ORF zwischen UL48 und UL49, 12 kDa) Kapsidprotein, außerdem aus einem 28 kDa Protein. Von den 208 Leserahmen kodieren 54 für potentielle Glykoproteine (Chee et al., 1990). Bisher konnten aber nur 4 Proteine mit Sicherheit in der Hülle identifiziert und ORFs zugeordnet werden (Spaete et al., 1994): gpUL55 (gB), gpUL75 (gH), gpUL100 (gM) und gpUL4 (gp48). Die Lokalisation anderer wie gL (UL115) in der Virionhülle ist noch nicht gesichert. Die restlichen Strukturproteine sind wahrscheinlich Bestandteile des Teguments. Auf dessen Funktion und Zusammensetzung wird weiter unten eingegangen.

1.4 Replikation und Infektionszyklus

Der Infektionszyklus wird durch die Bindung eines Virions an Heparansulfate auf der Oberfläche der Wirtszelle eingeleitet (Compton et al., 1993). Die spezifische Adsorption wird wahrscheinlich durch die viralen Glykoproteine gB und gH vermittelt, für die zelluläre Bindungspartner in der Größenordnung von 30 kDa (Taylor & Cooper, 1990) und 92 kDa (Keay et al., 1989) identifiziert wurden. Die anschließende Penetration erfolgt durch Verschmelzung der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle in einem pH-unabhängigen Fusionsprozeß (Compton et al., 1992). Die Tatsache, daß das Glykoprotein B (gpUL55) eine fusogene Domäne besitzt, die Zell-Zell-Fusion vermittelt (Bold et al., 1996), macht es wahrscheinlich, daß dieses Protein an der Verschmelzung beteiligt ist. Nach Penetration trennt sich das Tegument und Kapsid. Es gibt Hinweise, daß das Kapsid zur Kernhülle transportiert wird, von wo die virale DNA auf noch ungeklärte Weise in den Kern gelangt (Sodeik et al., 1997). Wie bei allen Herpesviren erfolgt die virale Replikation und Transkription im Nukleus. Die Genexpression ist abhängig von der Transkriptions- und Translations-Maschinerie der Wirtszelle. Sie folgt einem koordinierten kaskadenartigen Muster, das grob in drei Phasen eingeteilt werden kann: in die sehr frühe, die frühe und die späte Phase, wobei die Transkription der Gene einer Phase von der vorherigen abhängig ist. Die erste Klasse von RNAs, die sehr frühen (IE) oder α -Transkripte, werden unmittelbar nach Infektion von der eingescheuten DNA exprimiert. Die Transkription der IE RNAs ist unabhängig von der Synthese viraler Proteine und steht unter Kontrolle des starken major immediate early promoter/enhancer (MIEP; Stamminger & Fleckenstein, 1990). Dieser wird durch zelluläre Faktoren, aber auch durch das inokulierte Tegumentprotein pp71 transaktiviert (Liu & Stinski, 1992). Die Expression der frühen (E) oder β -Gene beginnt etwa 3 h p.i. und ist abhängig von der vorausgegangenen Expression der IE Gene. In der sehr frühen und frühen Phase werden Gen-Produkte exprimiert, die regulatorisch auf die virale Genexpression und den Wirtszellmetabolismus wirken. Außerdem gehören zu den frühen Genen die 6 für die DNA-Replikation notwendigen Faktoren einschließlich der viralen DNA-Polymerase (UL54) und des eng assoziierten Prozessivitätsfaktors pp52 (UL44). Der Wechsel von früher zu später Phase erfolgt etwa 24 - 36 h p.i. Die späten oder γ -Gene kodieren für Strukturproteine, und ihre Expression ist abhängig von der frühen Genexpression. Sie können nochmal danach unterteilt werden, ob ihre Produkte reduziert (g1) oder gar nicht (g2) synthetisiert werden, wenn die virale DNA-Replikation gehemmt wird. Die Regulation der Expression früher und sehr früher Gene erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen auf Ebene der Transkription, für späte Gene gibt es Hinweise, daß sie zusätzlich durch posttranskriptionale Mechanismen reguliert werden (Geballe et al., 1986). Die Replikation viraler DNA kann bereits 14 - 16 h p.i. nachgewiesen werden, sie steigt zusammen mit der Expression der dafür notwendigen Faktoren zunächst nur langsam an, so daß hohe Replikationsraten erst in der späten Phase zustande kommen. Das Virus kodiert für alle für die DNA-Replikation notwendigen Proteine. Sie erfolgt durch Zirkulierung des linearen Genoms und rolling circle - Synthese. Das resultierende Concatamer wird anschließend in Einzeleinheiten gespalten. DNA-Replikation und Proteinsynthese sind offensichtlich eng miteinander verbunden. Insgesamt beginnt der Infektionszyklus schnell nach Infektion, die virale Replikationsaktivität vollzieht aber einen nur langsamen Anstieg am Übergang von früher zu später Expression bis 72 h p.i., einem Zeitpunkt, an dem auch die massenweise Freisetzung von infektiösem Virus einsetzt. Diese Produktivität bleibt dann z. T. für mehr als eine Woche auf hohem Niveau. Obwohl in vivo eine Vielzahl von Zelltypen infiziert werden, ist das Wirtszellspektrum in vitro sehr beschränkt. HCMV repliziert in vitro am produktivsten in primären, differenzierten Fibroblasten. Undifferenzierte Zellen sind in der Regel nicht permissiv. Die wenigen permissiven Zelllinien weisen eine um mehrere Größenordnungen geringere Produktivität auf. Die humane Astrozytoma-Zelllinie U373MG erreicht dabei noch einen relativ hohen Titer.

Die Infektionskinetik in diesen Zellen ist vergleichbar mit der in humanen Fibroblasten (Duclos et al., 1989), so daß sie sich als stabiles Zellsystem für HCMV eignen.

1.5 Morphogenese und Reifung

1.5.1 Kapsidmorphogenese

Abbildung 1.2: Kapsidmorphogenese (nach Gibson, 1996). Näheres s. Text

Die Morphogenese der Virionen beginnt im Kern mit dem Zusammenbau der Kapsomere zu Kapsiden. Erste Vorläufer können ultrastrukturell etwa 48 h p.i. nachgewiesen werden. Aus den Kernen infizierter Zellen können drei Formen von Kapsiden isoliert werden, die nach ihrer Erscheinungsform bezeichnet werden: A (leere), B (frühe) und C (gefüllte), obwohl diese Bezeichnungen ursprünglich auf ihre Reinigungsmethoden basierten (Rixon, 1993). Die Kapsid-Morphogenese ähnelt der anderer Herpesviren. Nach dem Modell von Gibson (Gibson, 1993; Abbildung 1.2) bilden die sog. B-Kapside die erste Form der Reifung. Diese Form enthält noch keine DNA und besteht aus den oben erwähnten Kapsidproteinen, außer- dem enthält sie das assembly protein (Robson & Gibson, 1989), die Serin-Protease assemblin (Welch et al., 1991) und einige weniger abundante Bestandteile. Morphologisch besitzt das B-Kapsid eine innere und eine äußere Kapsel, wobei die äußere aus den Kapsid- proteinen und die innere aus dem assembly protein besteht. Es wird angenommen, daß die innere Kapsel als ein scaffold oder Konstruktionsgerüst für den Zusammenbau des Kapsids dient. Eine spezifische Interaktion des assembly protein und dem großen Kapsidprotein konnte inzwischen in vitro gezeigt werden (Wood et al., 1997). In einer Vorstufe, dem PreB- Kapsid, liegt das assembly protein zunächst noch in einer ungespaltenen Form vor. Im Laufe der Reifung zum eigentlichen B-Kapsid wird es durch die Protease assemblin gespalten. Auf noch ungeklärte Weise werden die Spaltprodukte entfernt, so daß die virale DNA in das jetzt leere Kapsid eingepackt werden kann. Die DNA-haltigen Kapside werden als C-Kapside bezeichnet. NIEPs enthalten im Gegensatz zu reifen Virionen keine DNA, besitzen jedoch das assembly protein, so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese defizienten Partikel aus nicht prozessierten B-Kapsiden hervorgehen. Im vorgestellten Modell sind die leeren A- Kapside die wahrscheinlichen Intermediate nach Abbau der inneren Kapsel und vor dem Einbau der DNA. Der Einbau der als Concatamer synthetisierten DNA setzt eine Spaltungs- und Verpackungsaktivität voraus, die möglicherweise das Genprodukt von UL56 übernimmt (Bogner et al., in Vorbereitung).

1.5.2 Transport- und Reifungsknospfung

Abbildung 1.3: Schema des intrazellulären Transportes und der Reifung des humanen Zytomegalievirus

In den weiteren Reifungsschritten müssen die im Kern gebildeten Kapside den Kern verlassen, das Tegument anlagern und die Membranhülle mit den prozessierten Glykoproteinen erhalten bevor sie die Wirtszelle verlassen. Das derzeitige Wissen über den genauen Ablauf dieser Schritte beruht weitestgehend auf elektronenmikroskopischen Daten und wird noch immer kontrovers diskutiert. Viele Hinweise sprechen für ein Model, nachdem Kapside zweimal eine Wechselwirkung mit Membranen eingehen: die Transportknospfung und die Reifungsknospfung (Abbildung 1.3) (Rixon, 1993; Radsak et al., 1995). Durch die Transportknospfung überwinden die viralen Vorläufer die Kernhülle und gelangen ins Zytoplasma. Dabei muß das Virus einen ungewöhnlichen Mechanismus anwenden, da nach gängiger Vorstellung die Kernmembran in der Interphase nicht wie die Plasmamembran dynamischen Prozessen unterworfen ist und Materialtransport in der Regel nur durch die Kernporen stattfindet. Es gibt überzeugende Hinweise dafür, daß zunächst die starre Kernlamina durch Änderung des Phos- phorylierungszustands der Lamine A und C verändert wird und fokale Durchtrittsstellen für die Partikel erzeugt werden (Radsak et al., 1991). Daraufhin erfolgt ein Knospfungsprozeß (budding) an der inneren Kernmembran, der ultrastrukturell häufig beobachtet werden kann (Eggers et al., 1992). Die Kapside gelangen dadurch in den intermembranösen Spalt der Kernhülle und erhalten eine vorläufige Membran. Für den nächsten Schritt gibt es keine experimentellen Hinweise. Es kann daher nur postuliert werden, daß die temporäre Membran mit der äußeren Kernmembran fusioniert und die jetzt hüllenlosen Kapside ins Zytoplasma frei- setzt. Die Vielzahl der zytoplasmatischen Partikel und die Daten zu den folgenden Reifungsschritten macht diesen postulierten Prozeß sehr wahrscheinlich. Die zytoplasmatischen Kapside vollziehen daraufhin die Reifungsknospfung, bei der sie ihre Virionhülle erhalten

und ausgeschleust werden. Während dieses Prozesses lagern sich zytoplasmatische Membranzisternen an die viralen Partikel und umhüllen diese. Die Partikel erhalten dadurch eine Doppelmembran, von denen die äußere mit der Plasmamembran fusionieren und die einfach umhüllten Partikel freisetzen kann. Die innere Membran bildet dagegen die letztendliche Hülle der freigesetzten Partikel. In der späten Phase können auch mehrere Partikel in einer gemeinsamen äußeren Membran liegen. Die Natur der umhüllenden Membranzisternen ist noch nicht vollständig geklärt. Die Reifungsknospe vollzieht sich in der Nähe des Golgi-Apparates, es wurde daher angenommen, daß sich die Membranzisternen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ableiten. Experimente, bei denen das Tubuläre Endosom mit dem Flüssig-Phase-Marker Meerrettich-Peroxidase markiert wurden, deuten auf einen endosomalen Ursprung dieses Kompartiments hin (Tooze et al., 1993). Andererseits konnte die umhüllenden Membranen mit einem fluoreszierenden Analog des Ceramids markiert werden, das in nicht infizierten Zellen spezifisch TGN-Membranen ist (Brand et al., in Vorbereitung). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß auch Anteile des TGN beteiligt sind. Weiterhin ist ungeklärt, über welchen Weg die viralen Glykoproteine nach ihrer Prozessierung im Golgi-Apparat die Virushülle erreichen. Es konnten bereits Hinweise auf einen Transportweg über die Plasmamembran erbracht werden (Radsak et al., 1996). Ein direkter Transport vom TGN zum Umhüllungskompartiment ist aber ebenso denkbar. Über den Prozeß und den Ort der Tegumentation der Kapside ist noch weniger bekannt. C-Kapside können mit Tegument-Bestandteilen isoliert werden (Gibson, 1993), was dafür spricht, daß die Tegumentation nicht erst bei der Reifungsknospe erfolgt. Es bleibt trotzdem unklar, ob die Tegumentation zumindest teilweise bereits im Kern vollzogen wird oder erst im Zytoplasma. Dies ist möglich, da eine Reihe von Tegumentproteinen im Kern nachgewiesen werden können. Aus diesen Überlegungen wird deutlich, daß für das Tegument wahrscheinlich bei der Transportknospe, mit Sicherheit aber bei der Reifungsknospe eine zentrale Rolle im budding-Prozeß postuliert werden muß, da es die architektonische Verbindung zwischen Kapsid und Membran bildet.

1.5.3 Der Knospungs- und Sortierungs-Mechanismus

Abbildung 1.4.: Hypothetisches Modell des Knospungs- bzw. Umhüllungsprozesses eines Kapsids

Bei jedem Transport- und Knospungs-Prozeß (budding) ergibt sich das zentrale Problem, wie das zu transportierende Material erkannt und spezifisch von anderen Bestandteilen getrennt wird. Dieser Vorgang wird als Sortierung oder sorting bezeichnet. Übertragen auf die Morphogenese des HCMV stellt sich die Frage, wie sich Kapsid und Virusmembranproteine finden, um die Knospungsprozesse zu vollziehen. Für beide Prozesse während der Virusreifung, Transport- und Reifungsknospe, muß man eine spezifische Interaktion von Vorläuferpartikel und umhüllender Membran postulieren. Auf der Seite der Membrankompartimente sind wahrscheinlich die zytoplasmatischen Anteile der viralen Glykoproteine involviert. Ein möglicherweise beteiligter Faktor ist das Glykoprotein gB, das sowohl in der inneren Kernmembran (Radsak et al., 1990) als auch in der letztendlichen Virushülle nachgewiesen werden kann. Auf der Seite der Kapside müssen ein oder mehrere Tegumentproteine beteiligt sein, da sie das Kapsid vollständig umhüllen. Die Tatsache, daß DBs, die nur aus Tegumentmaterial bestehen, korrekt umhüllt und ausgeschleust werden, spricht für die Beteiligung des Teguments. In anderen Virussystemen werden Matrixproteine als zentrale Organisationselemente in budding-Prozessen verstanden. Das M-Protein der Paramyxoviren wird als das zentrale organisierende Element für den Zusammenbau und das budding der Virionen angesehen (Peeples, 1991). Das Matrix-Protein des HIV-1 kann sogar den Knospungsvorgang ohne andere Viruskomponenten induzieren (Wills & Craven, 1991). Bisher konnten jedoch noch keine Beweise für eine solche Rolle eines oder mehrerer HCMV-Tegumentproteine erbracht werden.

1.6 Zusammensetzung und Rolle des Teguments

Über die strukturelle Organisation des Teguments und über seine Funktion ist nur wenig bekannt. Neben der oben postulierten Rolle im Reifungsprozeß wird für einige seiner Bestandteile angenommen, daß sie als Inokulum sofort nach Penetration eines Virions Einfluß auf den Zellmetabolismus und die virale Transkription nehmen. Eine Reihe von Strukturproteinen des Virions wurden bisher dem Tegument zugeordnet, deren Tegumentlokalisation häufig jedoch nicht gesichert ist. Im folgenden sind die Molekulargewichte und ORFs, soweit bekannt, aufgelistet (Spaete et al., 1994): 212K (UL48), 150K (UL32),

71K (UL82), 65K (UL83), 28K (UL99), 58K und 67K (UL65). Die meisten dieser Proteine werden durch eine virion- assoziierte Proteinkinase phosphoryliert (Roby & Gibson, 1986). Die Funktion von p212 ist nicht bekannt. Es besitzt jedoch Homologie zu HSV UL36, für das es Hinweise auf eine Beteiligung an der DNA-Freisetzung aus dem Kapsid und den Beginn der DNA-Synthese gibt. Auch die Funktion von pp28 (Meyer et al., 1988) ist ungeklärt. Im Gegensatz zu anderen Tegumentproteinen konnte es nur im Zytoplasma und nicht im Kern infizierter Zellen nachgewiesen werden (Landini et al., 1987). Zu den am besten untersuchten Proteinen gehört das untere Matrixprotein pp65 (ppUL83) (Rüger et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, daß es eine assoziierte Proteinkinase-Aktivität besitzt (Somogyi et al., 1990) und sofort nach Infektion in den Kern transportiert wird (Schmolke et al., 1995a). Dort hat es die Fähigkeit, Chromosomen zu binden (Dal Monte et al., 1996a). Es bildet mit über 95% den größten Anteil der dense bodies, es gibt jedoch Hinweise, daß es selbst nicht im Virion-Tegument integriert ist (Landini et al., 1987). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß es für die Virion- Reifung in vitro nicht essentiell ist (Schmolke et al., 1995b). Das obere Matrixprotein pp71 (ppUL82) fungiert als Transaktivator von Promotoren mit ATF und AP-1 Elementen (Liu & Stinski, 1992). Auch das inokulierte pp71 wird in den Kern transportiert (Hensel et al., 1996), es kann dort also die Aktivität des MIEP hochregulieren. pp71 wird außerdem in geringem Maße in der frühen Phase exprimiert (Hensel et al., 1996), was dafür spricht, daß es auch in dieser Phase regulatorische Funktionen besitzt. Die Rolle des abundantesten Bestandteils des Teguments, pp150 (ppUL32), ist völlig ungeklärt. Dieses basische Phosphoprotein macht 20 % der Virionmasse aus (Gibson, 1983), ist aber verglichen dazu in infizierten Zellen unterrepräsentiert (Weiner & Gibson, 1983). pp150 ist das 1048 Aminosäure-Genprodukt des ORF UL32 (Jahn et al., 1987). UL32 wird als spätes Gen transkribiert zu einer mRNA von 6,2 kb Länge. Das errechnete Molekulargewicht des Genproduktes beträgt 114 kDa, in der SDS-PAGE migriert pp150 jedoch bei 150 kDa (Roby & Gibson, 1986). Es ist mehrfach phosphoryliert und an zwei Aminosäuren mit O-gekoppeltem N-Acetylglucosamin modifiziert (Greis et al., 1994). Seine hohe Immunogenität, die wahrscheinlich durch mehrere Beta-Faltblatt-Strukturen mit stark hydrophilen Abschnitten bedingt ist (Jahn et al., 1987), macht es zu einem wichtigen Gegenstand für die Diagnostik. Es besitzt keine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) wie pp65 und pp71, trotzdem findet man es in der späten Phase im Kern infizierter Zellen (Hensel et al., 1995), auch wenn es vorwiegend im Zytoplasma vorliegt. Seine nukleäre Lokalisation könnte bedeuten, daß es bereits im Kern an der Tegumentation der Kapside beteiligt ist. Damit wird es zu einem potentiellen Kandidaten für die Vermittlung von Membran-Interaktionen, sowohl während der Transport- als auch während der Reifungsknospe. Die Identifikation einer wachstumsdefizienten Mutante mit einer Deletion in UL32 (Zipeto et al., 1993), deutet auf eine essentielle Funktion von pp150 für die virale Replikation. Gerade wegen dieses Hinweises und wegen der Unterschiede zu anderen Tegumentproteinen wie pp65 und pp71 könnte eine weiterführende Funktionsanalyse von pp150 hilfreich sein, um nicht nur die Rolle dieses Tegumentproteins, sondern auch des Teguments allgemein während der Reifung und Infektion zu klären.

1.7 Molekularbiologische Ansatzmöglichkeiten

Für die Funktionsanalyse viraler Gene stehen in den meisten Systemen direkte genetische Methoden zur Verfügung, die eine Deletion oder Mutation des jeweiligen Gens erlauben. In bezug auf HCMV ist dies jedoch erst in Einzelfällen und nur für nicht-essentielle Gene gelungen (Jones & Muzithras, 1992; Schmolke et al., 1995b). Schwierigkeiten liegen zum einen an der Komplexität des viralen Genoms, zum anderen am Mangel eines Zellsystems, das die Komplementation mutierter Gene und die produktive Propagierung der Mutanten erlaubt. Als Alternative zur Deletion viraler Gene kann deren Hemmung durch antisense-(AS)-Nukleinsäuren erreicht werden. Die Applikation von AS-DNA oder -RNA ist eine Methodik zur selektiven Manipulation von Genaktivität. Dabei wird eine antisense-Sequenz verwendet, die komplementär zum kodierenden Strang des zu hemmenden Gens ist und dessen Expression blockiert (zur Übersicht s. Murray & Crockett, 1992). Es können drei unterschiedliche Klassen eingesetzt werden: Oligodesoxynukleotide (ODN), Ribozyme und mRNA. Die Applikation dieser Agenzien kann auf verschiedene Weise erfolgen. AS-RNA oder -ODN können durch Mikroinjektion oder Liposomen in die Zielzellen transferiert werden. ODN werden sogar aus dem Kulturüberstand aufgenommen. Die nachhaltigste Methode ist jedoch ein AS-RNA Expressionskonstrukt, das transient oder stabil in eine Zelle eingebracht wird und dort transkribiert wird. ODN haben zwar den Vorteil, daß man sie leicht chemisch synthetisieren und daß sie leicht applizierbar sind, sie haben jedoch nur eine geringe Halbwertszeit. Versuche, sie durch

Modifizierung der Phosphodiesterbindung zu stabilisieren, resultierten häufig in der Erhöhung toxischer Nebenwirkungen (Wagner, 1995). Ribozyme besitzen neben einer komplementären Sequenz noch eine katalytische, die die gebundene Substrat-RNA spalten kann. Jedoch haben auch Ribozyme genauso wie ODNs nur eine geringe Stabilität. Aus den dargestellten Charakteristika wird deutlich, daß für die Untersuchung von HCMV-Genen der Einsatz von AS-mRNA Expressionssystemen am günstigsten erscheint (Ripalti et al., 1993), da aufgrund des langen Replikationszyklus und insbesondere für effektive Hemmung später Gene wie UL32 eine lange und umfangreiche Versorgung mit dem inhibitorischen Agens notwendig ist.

1.8 Wirkung von antisense-mRNA

Im folgenden soll kurz die Wirkungsweise von antisense-(AS)-mRNA anhand des von Cornelissen (Cornelissen, 1989; Nellen & Lichtenstein, 1993) entwickelten Modells erläutert werden. Als zentrales Ereignis für die Wirkung von AS-Nukleinsäuren kann ihre Hybridisierung mit dem Transkript des zu hemmenden Gens angesehen werden. Diese Hybridisierung kann sowohl im Kern als auch im Zytoplasma erfolgen und löst damit unterschiedliche Inhibitionsmechanismen aus. Die Hybridisierung im Kern führt in den meisten Fällen zur Degradation der Duplices wahrscheinlich durch Doppelstrang-spezifische RNase analog zur RNase III von *E. coli* (Robertson, 1990). Auf diese Weise werden sense- und AS-mRNA in einem stöchiometrischen Verhältnis abgebaut. Dabei ist zu bedenken, daß durch Northern- Blot-Analyse nur der Gleichgewichtszustand der mRNA Menge gemessen werden kann, der sich aus Transkriptionsrate und Degradation ergibt. Die Detektion einer geringen Gleichgewichtsmenge von AS-mRNA kann also auch bedeuten, daß diese schnell durch Hybridisierung und Degradation verbraucht wird. Andere Möglichkeiten der Neutralisierung der Ziel-mRNA liegen in der Hemmung von Spleißvorgängen oder der Blockierung des mRNA-Exports aus dem Kern. So konnten bereits stabile Duplices nachgewiesen werden, die durch Hemmung des Transport die Genexpression inhibierten (Kim & Wold, 1985). Ob eine Duplex-Bildung zustande kommt, hängt im Einzelfall von einer Reihe von Faktoren ab. So kann die Ausbildung von Sekundärstrukturen oder RNA-bindenden Proteine die Hybridisierung erschweren. Ein anderer Mechanismus kann im Zytoplasma wirken. Die Translation an Ribosomen kann durch Ausbildung von RNA:RNA-Hybriden verhindert oder verzögert werden, da diese erst entwunden werden müssen. Aus diesem Grunde eignen sich vor allem Sequenzen, die zum 5'-Bereich einschließlich dem Startkodon komplementär sind. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß der Einsatz von AS-mRNA auch zur Untersuchung von HCMV-Genen geeignet ist (Bryant & Sinclair, 1993; Ripalti et al., 1995; Dal Monte et al., 1996b). Dabei hat sich vor allem der Einsatz von stabilen AS-mRNA exprimierenden Zellen als geeignet erwiesen, da diese nicht nur während des gesamten Infektionszyklus AS-mRNA transkribieren, sondern auch stabile Bedingungen für alle Untersuchungen garantieren.

1.9 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten Hinweise auf die noch völlig ungeklärte Funktion des Tegumentproteins pp150 (ppUL32) vor allem in Hinblick auf seine potentielle Rolle in der viralen Morphogenese gewonnen werden. Für die Untersuchung dieses späten Genprodukts sollte die Anwendbarkeit des AS-mRNA Inhibitionsansatzes geprüft werden, der bereits für sehr frühe und frühe Gene des HCMV erfolgreich eingesetzt wurde. Für diesen Zweck sollten stabil UL32 AS-mRNA exprimierende Zellen aus der permissiven Astrozytoma-Zelllinie U373MG hergestellt werden und der Effekt der pp150-Suppression in diesen Zellen untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge Modell J2-21 (Beckman, München mit den Rotoren: JA-14 und JA-20 (Beckman, München)
Tischkühlzentrifuge Modell RT 6000D mit dem Rotor A500 (DuPont Company, Wilmington, Delaware, USA)

Tischzentrifuge Modell Z 230 für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße (Hermle, Gosheim)
Zentrifuge Modell Z364 für die Zellkultur (Hermle, Gosheim)

Zell- und Bakterienkultur:

CO₂-begasbarer Brutschrank Modell B5060 EC (Fa. Heraeus, Hanau)

Brutschrank für Bakterienkultur (Memmert, Schwabach)

Schüttelinkubator für Bakterienkultur Modell G25 (New Brunswick Scientific Corporation Inc., Edison, USA)

Elektrophorese- und Blotting-Kammern: Gelapparatur für PAGE (Größe: 15 cm x 17,5 cm) (Eigenbau, Werkstatt der Universität Marburg)

Flachbettkammer für Agarosegele Modell GNA- 100 und Modell GNA-200 (Pharmacia, Freiburg)

Naß-Blot-Apparatur (Eigenbau, Werkstatt der Universität Marburg) (für Western-Blotting) Wasserbäder,

Schüttler und Heizblock Schüttler Modell KS 10 (Edmund Bühler, Tübingen)

Drehschüttler (Eigenbau, Werkstatt der Universität Marburg)

Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel)

Kühlwasserbad mit Umwälzpumpe Modell RM 3 (MWG, Lauda-Königshofen)

Wärmeblock Modell Dri-Block DB-1 (Techne, Dextford-Cambridge, England)

Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Optische Geräte: Fluoreszenzmikroskop Diaplan mit Camera (Leitz, Wetzlar)

Inverses Lichtmikroskop Wilovert S mit Kamera (Hund, Wetzlar)

Spektralphotometer Cadas 100 (Dr. Lange, Düsseldorf)

TKO Mini-Fluorometer (Fa. Hoefer, San Francisco, USA)

Leica M1 mit Reproduktionsgerät Reprovit II A (Leitz, Wetzlar)

MP-3 Land Camera (Polaroid, Cambridge, USA)

Sonstige:

Liquid-Szintillationszähler (Philipps, Eindhoven, Niederlande)

Handmonitor Modell LB 1210B (Berthold, Wildbach)

Milli-Q-Water-System (Millipore, Eschborn)

UV-Crosslinker Modell UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, Heidelberg)

UV-Schirm Modell Transluminator (UVP Inc., San Gabriel, USA)

Ultra-Schall-Gerät Labsonic 1510 (Braun-Melsungen, Melsungen)

Magnetrührer Modell IKA-Combimag RCH (IKA Labortechnik, Staufen)

pH-Meter Modell pH 522 (WTW, Weilheim)

Waage Modell 1219 MP (Satorius, Göttingen)

Feinwaage Modell H10T (Mettler, Schweiz)

Mikrowelle Modell R5150 (Sharp, Japan)

Pipetten der Firmen Abimed, Düsseldorf und Eppendorf, Hamburg

Autoklav (Lautenschläger, München)

Im weiteren Text wird auf die Geräte nur noch in Kurzform verwiesen.

2.2 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.A. und wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.

Im folgenden sind spezielle Chemikalien und ihre Hersteller aufgeführt:

Radiochemikalien:

L-[³⁵S]-Methionin (Amersham-Buchler, Braunschweig)

Szintillator RotiszintR 22 eco, Polyvinylpyrrolidon (Roth, Karlsruhe)

Säulenmaterial: Protein-A-Sepharose CL-4B (Sigma, Deisenhofen)

Molekularbiologische Substanzen und Enzyme:

Restriktionsenzyme u. Puffer (Gibco/BRL, Eggenstein)

T4-DNA-Ligase (Amersham-Buchler, Braunschweig)

Phosphatase aus Shrimps (SAP) und

RNase A, pankreatisch (Boehringer, Mannheim)

DNase I (Pharmacia, Freiburg)

Jetsorb (Genomed, Bad Oeynhausen)

DNA aus Kälberthymus, reinst (Serva, Heidelberg)

Größenstandards für die Elektrophorese: 1 kB DNA-Leiter (Gibco/BRL, Eggenstein) SDS-PAGE-Standard und Prestain SDS-PAGE-Standard (Biorad, München)

Mediengrundstoffe: Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefe-Extract (Difco, Detroit)

MEM, MEM ohne Methionin, Nicht-essentielle Aminosäuren (100x), Vitamine (100x) (Gibco/BRL, Eggenstein)

FKS (Seromed, Berlin)

Antibiotika:

Ampicillin (Binotal[®]) (Bayer, Leverkusen)

Penicillin G (Seromed, Berlin)

Streptomycin Sulfat (Seromed, Berlin)

Inhibitoren:

Aprotinin (Trasylo[®]) (Bayer, Leverkusen)

PMSF (Serva, Heidelberg)

Sonstiges:

Nitrozellulose (Schleicher & Schüll, Dassel)

Nylonmembran (ungeladen) (Qiabran, Qiagen, Hilden)

Hier nicht erwähnte Substanzen werden im Text beschrieben. Das im Text als H₂O bezeichnete Wasser wurde durch das Milli-Q-Water-System aufgereinigt.

2.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

PBS (phosphate buffered saline):

140 mM NaCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,25

TE-(Tris/EDTA) Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0

TAE (Tris/Acetat/EDTA) Puffer: 40 mM Tris, 1% (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA

Probenpuffer (DNA, RNA): (10 x konz.) 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 0,4% (w/v) Xylencyanol, 50% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA pH 8,0

20 x SSC (standard saline citrate) 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

MOPS Puffer 20 mM MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) pH 7,0, 8 mM Na-Acetate, 1 mM EDTA

2.4 Verwendete Antikörper

PAb XP1, Anti-pp150-Fusionsprotein (beta-Galaktosidase-pp150 As 555-705) vom Kaninchen (Behringwerke, Marburg) ([Scholl et al., 1988](#))

MAb 27-156, anti-gB (gpUL55) von der Maus (Spaete et al., 1994), freundlicherweise von Prof. Britt (Birmingham, Alabama, USA) zur Verfügung gestellt

MAB BS510, anti-pp52 (ppUL44) von der Maus (Plachter et al., 1992), freundlicherweise von Prof. Plachter, Mainz, zur Verfügung gestellt PAB

BGE1, anti-pp65-Fusionsprotein (Gluthation-S-Transferase-pp65 As 325-511) vom Kaninchen (Hensel et al., 1995)

Anti-CMV, early nuclear protein (IgG2a) von der Maus (Dupont, Wilmington, USA)

TRITC-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein (Dako, Hamburg)

TRITC-konjugiertes Anti-Maus-IgG vom Kaninchen (Dako, Hamburg)

Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege (Biorad, München)

Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus-IgG von der Ziege (Biorad, München)

Kaninchen-a-Maus IgG (Dako, Hamburg)

2.5 Methoden zur Vermehrung von Plasmid-DNA

2.5.1 Bakterienstämme

Folgende Escherichia coli (E. coli) Bakterienstämme wurden für die Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet (Winnacker, 1985) :

Stamm	Genotyp
DH5a	F-O- recA1 endA1 hsdR17 (rK-,mK+), D(lacZYA-argF)U169F80d lacZDM15 supE44 thi-1 gyrA96 relA1
XL1-Blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F [proAB+ lacIq lacZDM15 Tn10(tetr)]

2.5.2 Vermehrung und Langzeitlagerung der Bakterien

Medien:

(1) LB-Medium:

1% (w/v) Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA)

0,5% (w/v) Hefeextrakt (Difco, Detroit, USA)

1% (w/v) NaCl pH 7,4 (eingestellt mit 1 N NaOH)

(2) Psi-Medium:

2% (w/v) Bacto-Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

0,4% (w/v) MgSO₄

10 mM KCl pH 7,6 (eingestellt mit 1 N KOH)

Alle Medien wurden mit Milli-Q-Wasser (Fa. Millipore, Eschborn) angesetzt und anschließend autoklaviert. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA). Zur selektiven Vermehrung von Plasmid-enhaltenden Bakterien wurde den Medien nach Autoklavieren und Abkühlen auf 40-50 °C folgendes Antibiotikum zugesetzt: Ampicillin (Boehringer, Mannheim), Endkonzentration 50 µg/ml. Zur Vermehrung von E. coli wurde eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium) mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft und nach Kultivierung ü. N. in 200 ml LB-Medium überimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in einem Inkubationsschüttler (Modell G25) bei 37° C mit 250 UpM. Zur Langzeitlagerung wurden 5 ml-Kulturen exponentiell wachsender E. coli bei 3000 UpM (Tischkühlzentrifuge, Rotor A500) für 10 min sedimentiert, das Bakterienpellet in 1,6 ml LB-Medium/40% (v/v) Glycerin resuspendiert und in Einfrierröhrchen (Fa. Costar, Cambridge, USA) bei -80° C eingefroren. Die Vermehrung und Lagerung von E. coli erfolgte stets in sterilen Glas- oder Plastikgefäßen.

2.4 Verwendete Antikörper

2.5.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (n. Cohen et al., 1972)

Bakterien lassen sich zur spontanen Aufnahme von Fremd-DNA (Transformation) durch eine Behandlung mit eiskaltem Calcium- und Rubidiumchlorid befähigen. Hierzu wurden 5 ml Psi-Medium (s. 2.2) mit einer Bakterienkolonie beimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 bei 37° C und 250 UpM im Inkubationsschüttler (Modell G25) inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 100 ml Psi-Medium inokuliert und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,48 kultiviert. Die Zellen wurden bei 4° C mit 2500 UpM für 5 min in einer Tischkühlzentrifuge (Rotor A500) sedimentiert und in 30 ml eiskaltem TFB I (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis inkubiert. Die Inkubationszeit betrug für XL1 Blue-Zellen 1,5 h, für DH5a 2 h. Nach erneuter Zentrifugation bei 2500 UpM für 5 min wurden die sedimentierten Bakterien in 4 ml TFB II (10 mM MOPS pH 7,0, 10 mM RbCl₂, 75 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin) aufgenommen und in 200 µl-Portionen bei -80° C gelagert.

2.5.4 Transformation von E. coli (modifiziert n. Hanahan, 1983)

200 µl transformationskompetente Bakterien (s. 2.5.3) wurden bei RT aufgetaut und sofort für 5 min auf Eis gestellt. Die Plasmid-DNA in TE-Puffer (pH 8,0) wurde zugegeben (< 0,1 µg/200 µl Bakteriensuspension) und die Zellsuspension weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf 42° C erwärmt und nach weiteren 2 min auf Eis 800 µl Psi-Medium (s. 2.5.2) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37° C und 150 UpM im Inkubationsschüttler (Modell G25) wurden die transformierten Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf Antibiotikum-enthaltende LB-Agarplatten ausgestrichen und ü. N. bei 37° C im Brutschrank (Fa. Memmert, Schwabach) inkubiert.

2.5.5 Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab

Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab wurde mit dem QIAprep-spin Plasmid Kit der Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die unten erwähnten Puffer wurden mitgeliefert. Es wurden 2 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (s. 2.5.2) mit einem Bakterienklon inokuliert und ü. N. bei 37° C im Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden dann nach einem Protokoll lysiert, denaturiert und renaturiert, das weitestgehend dem von (Sambrook et al., 1989) entspricht: Die Zellen wurden bei 10000 x g sedimentiert und in 250 µl Puffer P1 (RNase-A-haltiger Lysisbuffer) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2 (Denaturierungspuffer) wurde die Lösung 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 350 µl eisgekühlter N3 (Renaturierungspuffer) zugegeben und nach vorsichtiger Mischung 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat von Protein und genomischer DNA wurde bei 10000 x g sedimentiert und der Überstand auf die mitgelieferten Zentrifugations-Säulen aufgetragen. Nach einem Durchlauf für 60 s bei 10000 x g erfolgte die Waschung der Säule bei gleichen Zentrifugationsbedingungen in folgenden Schritten: einmal 0,5 ml Puffer PB (Guanidinhydrochlorid-haltig) und zweimal 0,75 ml Puffer PE (Ethanol-haltig). Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8 eluiert, wobei in der Regel eine Ausbeute von 0,1 µg/µl erreicht wurde.

2.5.6 Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab

Plasmid-Isolierungen im präparativen Maßstab wurden mit dem QIAGEN plasmid purification Kit der Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt, das aus einer DNA-bindenden Säule (QIAGEN-tip 500) und den notwendigen Puffern bestand. Die Freisetzung der bakteriellen Plasmid-DNA erfolgte prinzipiell nach dem Protokoll von (Sambrook et al., 1989). Die Bakterien einer 500 ml-ü. N.-Kultur in LB-Medium (s. 2.5.2) wurden in der Tisch- kühlzentrifuge (Rotor A500) bei 5000 UpM für 15 min und 4 C sedimentiert und anschließend in 10 ml Puffer 1 (RNase-haltiger Lysispuffer) vollständig resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 10 ml Puffer 2 (Denaturierungspuffer) versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Darauf wurde sie mit 10 ml eisgekühltem Puffer P3 (Renaturierungspuffer) versetzt, sofort und vorsichtig gemischt und nochmal für 20 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde nun durch Filtration durch ein Papiertuch entfernt und das Filtrat durch Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (Modell J2-21, Rotor JA-20, Corex- Röhrchen) für 30 min bei 10000 UpM und 4° C von Präzipitat-Resten befreit. Nach Äquilibration der Säule mit 10 ml Puffer QBT wurde die Lösung aufgetragen. Der Durchfluß erfolgte durch Schwerkraft. Die Säule wurde dann zweimal mit

Puffer QC gewaschen und mit 15 ml Puffer QF eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurde das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol (RT) versetzt und wie oben in der Kälzentrifuge (Modell J2-21, Rotor JA-20, Corex-Röhrchen) für 30 min bei 10000 UpM und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Sediment mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem die DNA getrocknet war, wurde sie in 500 µl 10 mM Tris-HCl pH 8 gelöst, wobei in der Regel eine Ausbeute von 0,5- 1,0 µg/µl erreicht wurde.

2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.6.1 Restriktionsspaltung

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Gibco BRL (Eggenstein) gespalten. Die Reaktionen verliefen in den jeweiligen mitgelieferten Puffern für 1-4 h. Die DNA- Konzentration überstieg dabei nicht 0,5 µg/µl. Das Enzym wurde im leichten Überschuß (1-5 U/µg DNA) eingesetzt, wobei die Endkonzentration von Glycerol 5% (v/v) nicht überschritten wurde.

2.6.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA zur Analyse und Präparation

Agarose-Gelelektrophorese von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgte in horizontalen Elektrophorese-Apparaturen. Agarose wurde dazu in TAE-Puffer geschmolzen (1% (w/v)). Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in den Gelträger gegossen, in den ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt war. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt und das Gel mit Laufpuffer (TAE-Puffer) überschichtet. Die Proben wurden mit 20% Auftragspuffer (s. 2.3) versetzt und in die Probenaschen geladen. Die DNA wurde bei einer Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand je nach Erfordernissen für 0,5-3 h aufgetrennt. Durch die Einlagerung des EtBr konnte die DNA mit einem Transilluminator (Anregung 234 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurde nach Restriktionsspaltung und gelelektrophoretischer Auftrennung mit dem Jetsorb-Kit (Fa. Genomed, Bad Oeynhausen) aus Agarose-Gelen isoliert. Dazu wurde die entsprechende Bande im UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß geeigneter Größe überführt. Je 100 mg Gel wurde 10 µl Jetsorb-Suspension (Silika- Suspension, Bindungskapazität 7,5 µg DNA/10 µl) in 300 µl Puffer A1 gegeben und bei 50° C 15 min solubilisiert. Die Glasmatrix mit der gebundenen DNA wurde sedimentiert (60 s bei 10000 x g), einmal mit Puffer A1 und zweimal mit Puffer A2 gewaschen. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand abgesaugt, das Sediment getrocknet und in 10-50 µl H₂O resuspendiert. Durch fünfminütige Inkubation bei 50° C wurde die DNA von der Matrix abgelöst. Der DNA-haltige Überstand wurde durch Zentrifugation bei 10000 x g für 5 min gewonnen. Die DNA-Konzentration wurde durch Vergleich mit Mengenstandards im Agarose-Gel abgeschätzt.

2.6.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Religation der linearisierten Vektoren zu erschweren, wurden deren 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde 10 µg Vektor-DNA in 40 µl H₂O mit 5 µl Shrimps-Alkalische- Phosphatase (SAP, 1 U/µl, Fa. USB) und 5 µl mitgeliefertem 10 x SAP-Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM MgCl₂) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1,5 h bei 37 C wurde die SAP 15 min bei 65° C inaktiviert. Anschließend wurde die Vektor-DNA entweder über ein Agarose-Gel oder direkt durch Fällung mit Jetsorb (s. 2.6.3) aufgereinigt.

2.6.5 Konversion 5'-überhängender Enden zu blunt-ends (n. Sambrook et al., 1989)

Waren die Klonierungsstellen von Vektor und Insert nicht kompatibel, wurden die 5'-Überhänge in Anwesenheit der entsprechenden Nukleotide mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zu blunt-ends konvertiert. Die Auffüllreaktion erfolgte direkt nach dem Restriktionsverdau im jeweiligen Puffer der Restriktionsenzyme durch die Zugabe der erforderlichen Nukleotide (Endkonz.: 0,5 mM dNTP) und 1 µl Klenow-Enzym (Fa. Gibco BRL, Eggenstein; 1 U/µl). Der Zusatz der dNTPs richtete sich jeweils

nach der Basenzusammensetzung des erzeugten Überhangs. Die Reaktion wurde für 30 min bei RT durchgeführt, anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 71° C für 15 min inaktiviert und die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und isoliert (s. 2.6.3).

2.6.6 Ligation

Ligationen von Vektor- und Insert-DNA erfolgten in 10 µl Reaktionsansätzen mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA betrug etwa 1:2 bis 1:10. Die Gesamtkonzentration der DNA betrug etwa 100 ng/µl. Die in H₂O gelöste DNA wurde auf ein Volumen von 8 µl gebracht und mit 1 µl 10 x Ligationspuffer (0,66 M Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M MgCl₂, 0,15 M DTT, 10 mM Spermidin, 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA Ligase (Fa. Gibco BRL, Eggenstein; 1 U/µl) versetzt. Die Reaktion wurde bei 12° C ü. N. durchgeführt. Die Ligationseffizienz wurde gelelektrophoretisch (s. 2.6.2) überprüft. Dazu wurden je 1 µl des Reaktionsansatzes vor Zugabe des Enzyms und nach Ligationsende aufgetrennt und verglichen. Bei erfolgter Reaktion wurde die verzögerte Bande der zirkulären DNA sichtbar.

2.7 Herstellung der verwendeten DNA-Konstrukte

2.7.1 Verwendete Vektoren

Zur stabilen und zur transienten Transfektion von U373MG wurde der eukaryontische Expressionsvektor pRC/CMV (Fa. Invitrogene) ([Abb. 2.1](#)) verwendet. Er diente zur stabilen Expression von UL32-Fragmenten in sense- und antisense-Orientierung in den Inhibitions- experimenten wie auch zur transienten Expression des gesamten ORF UL32 in Lokalisationsexperimenten. Von diesem Vektor erfolgt eine in eukaryontischen Zellen konstitutive Expression des in den Polylinker eingefügten Genfragments unter der Kontrolle des Major Immediate Early Promoter/Enhancers (MIEP) von HCMV. Die entstehende mRNA wird durch das Polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormons (BGH pA) polyadenyliert. Als Selektionsmarker enthält es das Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des SV40 early Promoters. Für Subklonierung von UL32-Fragmenten und zur in-vitro-Transkription von UL32- Abschnitten für die Herstellung von RNA-Sonden wurde der Vektor pBluescript II KS(-) (Fa. Stratagene) ([Abb. 2.2](#)). Er besitzt einen umfangreichen Polylinker (multiple cloning site), die von den T3- und T7-Phagen-Promotoren flankiert wird. Der Replikationsursprung ColE1 ori garantiert eine hohe Kopienzahl in Bakterien. Außerdem besitzt er ein Ampicillin- Resistenz-Gen zur antibiotischen Selektion von transfizierten Zellklonen.

Abbildung 2.1: Eukaryontischer Expressionsvektor pRC/CMV

Abbildung 2.2: Vektor pBluescript II KS

2.7.2 Herstellung von UL32 sense- und antisense-Expressionskonstrukten für Inhibitionsexperimente

Für die Herstellung der UL32 Expressionskonstrukte wurden parallel zwei UL32 DNA- Fragmente in sense- und antisense-Orientierung in den Vektor pRC/CMV kloniert: das 2 kb SstII-ApaI 5' Fragment und das 3,5 kb 3' Fragment. Als Quelle für diese Klonierungen diente das Cosmid pCM1017 ([Fleckenstein et al., 1982](#)), das die HindIII-Fragmente [M, Z, J, N,Y] des HCMV AD169 Genoms enthielt. UL32 liegt auf dem HindIII-Fragment J. Für die genauen Klonierungsverfahren s. 2.6. Die folgenden Klonierungsschritte sind schematisch in [Abb. 2.3](#). dargestellt. Die Numerierung der Basensequenz von UL32 erfolgt nach [Jahn et al., 1987](#). Zunächst wurde das 2103 bp SstII-DNA-Fragment (UL32 bp -83 bis +2020) aus dem Cosmid pCM1017 geschnitten und nach Entfernung der 3' -überhängenden Enden in die SmaI-Schnittstelle des pBluescript II KS(-) blunt-end ligiert. Das dadurch entstandene Konstrukt pBS-SmaI trug das UL32-Fragment in sense-Orientierung relativ zum b- Galaktosidase-Gen. Im zweiten Schritt wurde das 2049 bp ApaI DNA-Fragment (UL32 bp - 83 bis +1993) aus pBS-SmaI geschnitten. Dieses Fragment enthielt neben der viralen Sequenz am 5' -Ende noch 55 bp des Polylinkers von pBluescript. Dieses 5' UL32-Fragment wurde in sense- und antisense-Orientierung in die ApaI-Schnittstelle des pRC/CMV kloniert, wodurch die Expressions-Konstrukte pRc-ApaI/S und pRc-ApaI/AS entstanden. Für die Klonierung der Konstrukte, die das UL32 3' -Fragment enthielten, wurde das 3536 bp EcoRI-DNA-Fragment (UL32 bp 337 bis 3873) aus dem Cosmid pCM1017 geschnitten und in sense- und antisense-Orientierung in die EcoRI-Schnittstelle des

pBluescript kloniert. Dadurch entstanden die Konstrukte pBS-Eco/S und pBS-Eco/AS. Aus beiden Konstrukten wurden parallel die 3578 bp HindIII/XbaI-Fragmente herausgeschnitten und in pRC/CMV ligiert, der zuvor mit HindIII und XbaI linearisiert worden war. Dadurch entstanden die Expressions-Konstrukte pRc-Eco/S und pRc-Eco/AS mit dem 3,5 kb 3' UL32-Fragment in sense- bzw. antisense-Orientierung relativ zum Promoter.

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Klonierung der UL32 antisense- und sense-Expressions-konstrukte. Numerierung der bp n. Jahn et al., 1987

2.7.3 Herstellung eines UL32 Expressionskonstruktes mit dem gesamten Leserahmen für Lokalisationsexperimente

Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes pRC-150ST/S für die Expression des gesamten Leserahmens UL32.

Für die Herstellung eines UL32-Expressionskonstruktes (Abb. 2.4.) wurde der gesamte Leserahmen UL32 in zwei Schritten in pRC/CMV kloniert. Dazu wurde zunächst das 2 kb HindIII/ApaI Fragment (UL32 -83 bis +1993) aus dem Konstrukt pBS-SmaI (s. 2.7.2) geschnitten und in den zuvor mit HindIII und ApaI linearisierten pRC/CMV ligiert. Dadurch entstand das Konstrukt pRc-150/5P, das das UL32-Fragment in sense-Orientierung relativ zum Promoter trug. In einem zweiten Schritt wurde das 3' UL32 1929 bp ApaI Fragment aus dem Konstrukt pBS-Eco/S (UL32 +1993 bis +3873) geschnitten und so in die ApaI-Schnittstelle von pRc-150/5P kloniert, daß es den bereits inserierten UL32 5' -Bereich zum gesamten Leserahmen UL32 vervollständigte. Das so entstandene Konstrukt wurde mit pRC- 150ST/S bezeichnet. Um ein Kontrollkonstrukt zu generieren, das UL32 in antisense-Orientierung relativ zum Promoter trug, wurde der gesamte Leserahmen pRC-150ST/S mit HindIII herausgeschnitten und das resultierende 4 kb Fragment in umgekehrter Orientierung wieder inseriert. Dieses Konstrukt wurde mit pRC-150ST/AS bezeichnet.

2.7.4 Herstellung eines Konstruktes zur in-vitro-Translation von UL32 RNA-Sonden

Um kurze UL32-spezifische RNA-Sonden herstellen zu können, wurde ein UL32 385 bp Fragment in pBluescript kloniert, wo es ausgehend vom T3- und T7-Promoter in sense- bzw. antisense-Orientierung transkribiert werden konnte. Dazu wurde das UL32 385 bp Fragment aus pBS-SmaI (UL32 bp +1563 bis +1948) in die SmaI-Schnittstelle des pBluescript blunt- end ligiert, so daß es in sense-Orientierung relativ zum b-Galaktosidase-Gen inseriert wurde. Dieses Konstrukt wurde mit pBUL32/S1-A5 bezeichnet.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Zellen

Menschliche Vorhaut-Fibroblasten (HFF) waren aus Säuglingspräputien isoliert worden und wurden freundlicherweise von Prof. K. Radsak zur Verfügung gestellt. Sie wurden von der 10. bis zur 20. Passage für experimentelle Arbeiten verwendet. HFF wurden für die in-vitro- Vermehrung von HCMV und für die Titerbestimmung von Überständen infizierter U373MG eingesetzt.

Die Astrozytom-Zelllinie U373MG wurde von der American Type Culture Collection (Maryland, USA) bezogen.

2.8.2 Medien und Lösungen

Fibroblasten-Kulturmedium (MEM/10% FKS):

- 9,5 g/l Eagle's MEM (Gibco/BRL)
- 100 ml/l FKS (Seromed, Berlin)
- 10 ml/l MEM Vitamin-Lösung (100x) (Gibco/BRL)
- 10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren (100x) (Gibco/BRL)

2.7.2 Herstellung von UL32 sense- und antisense-Expressionskonstrukten für Inhibitionsexperimente

2,2 g/l NaHCO₃
100000 IE/l Penicillin G
10 mg/l Streptomycin-Sulfat

U373MG-Kulturmedium (DMEM/10% FKS):

13,4 g/l Dulbecco's MEM (Gibco/BRL)
100 ml/l FKS (Seromed, Berlin)
3,7 g/l NaHCO₃
6 g/l (25 mM) HEPES
100000 IE/l Penicillin G
10 mg/l Streptomycin-Sulfat

Trypsin/EGTA-Lösung:

0,25 % Trypsin (w/v) (Seromed, Berlin)
5 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) (Sigma, Deisenhofen)
in PBS pH 7,4

2.8.3 Kultivierung

Alle Zellen wurden für Züchtung und Experimente bei 37° C im 5%-CO₂-begasten Brutschrank gehalten. Als Kulturgefäße dienten Plastik-Schalen oder -Flaschen (Fa. Costar, Cambridge, USA, oder Fa. Greiner, Frickenhausen). Menschliche Vorhaut-Fibroblasten wurden in Fibroblasten-Kulturmedium (s. 2.8.2) propagiert und jede Woche 1:5 passagiert. U373MG wurden in U373MG-Medium (s. 2.8.2) kultiviert und einmal pro Woche 1:5 - 1:10 passagiert. Für die Passage wurde der konfluent gewachsene Zell-Monolayer zweimal mit PBS gewaschen und anschließend solange in Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert bis sich die Zellen abgelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium suspendiert und im gewünschten Verhältnis auf Kulturgefäße verteilt. Zur Langzeitlagerung wurden HFF in MEM/40% FKS und U373MG in DMEM/40% FKS nach Zugabe von 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in Einfrierröhrchen (Fa. Costar, Cambridge, USA) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.9 Virus und Infektion

2.9.1 Virus-Stamm

Alle Untersuchungen wurden mit dem Laborstamm AD169 ([Gupta et al., 1977](#)) des humanen Zytomegalievirus durchgeführt.

2.9.2 Gewinnung eines infektiösen Virus-Stocks

Zur Anzucht wurden HFF in Infektionsmedium (Kulturmedium mit nur 2% FKS) kultiviert. Der konfluent Monolayer wurde mit einer Multiplizität von 0,1 (infektiöse Einheiten pro Zelle) durch Zugabe des Virus zum Kulturmedium infiziert. Nach einer Inkubation von etwa 10 Tagen im geschlossenen System zeigten fast alle Zellen einen deutlichen CPE (zytopathischen Effekt). Das Medium wurde abgenommen, 10 min bei 1000 x g von Zellbestandteilen befreit und als Virusstammsuspension bei -80° C gelagert.

2.9.3 Virus-Titer-Bestimmungen

Die Virus-Titer wurden durch Infektion von HFF-Kulturen in einer Endpunktverdünnung gemessen. Dabei wurde nicht die absolute Zahl infektiöser Einheiten bestimmt, sondern die TCID₅₀ (tissue culture infective dose 50). Diese Bestimmung ermittelt die Verdünnung, bei der 50% der behandelten Kulturen infiziert werden. Eine umfassende Darstellung dieser Bestimmung findet sich in ([Leland & French, 1988](#)). Dazu wurden HFF-Kulturen in 96-well- plates ausgesät (2 x 10⁴ Zellen/Kultur). Am folgenden Tag wurde eine

zehnfache Verdünnungsreihe des zu messenden Kulturüberstandes anlegt und je 4 HFF-Kulturen mit 100 µl jeder Verdünnung infiziert (s. 2.9.4). Als Kontrollen dienten nicht-infizierte und Virusstock- infizierte Kulturen. Zum Nachweis der Infektion einer Kultur diente die Detektion von HCMV-IE-Antigen in den Kernen infizierter Zellen. Für diesen Nachweis wurden die Kulturen einen Tag p.i. 20 min bei - 20 C mit 75% Methanol-25% Azeton in der Kulturplatte fixiert, getrocknet und bei -20 C gelagert. Zur Färbung wurden die Zellen nacheinander in folgenden Schritten bei RT behandelt: Rehydratation und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 100 µl PBS-1% BSA, Reaktion des Erstantikörpers für 1 h mit 50 µl a-IE-Antikörper (Dupont, Wilmington, USA) (s. 2.4) 1:100 in PBS-1% BSA, dreimaliges Waschen mit PBS, Reaktion des Zweitantikörpers für 30 min mit 50 µl a-Maus-IgG-HRP (s. 2.4) 1:1000 in PBS-1% BSA, dreimaliges Waschen mit PBS und Farbnachweis in Entwicklerlösung (0,5 mg/ml 3,3 - Diamino-benzidin-hydrochlorid (DAB, Fa. Fluka, Neu-Ulm), 0,03% (v/v) H₂O₂ in PBS) für mindestens 20 min bis die Positiv-Kontrolle gut erkennbare Kernfärbungen zeigte. Die Auszählung infizierter Kulturen erfolgte an einem inversen Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar). Ein gefärbter Zellkern pro Kultur reichte aus für ihre Einstufung als infiziert.

Da nicht immer zufällig ein Verdünnungs-Endpunkt erreicht wurde, bei dem genau 50% der Kulturen infiziert wurden, wurde dieser rechnerisch nach Spearman und Kärber (Spearman, 1908; Kärber, 1931) wie folgt ermittelt:

Negativer Log. des 50%-Endpunktes = Negativer Log. der höchsten verwendeten Viruskonzentration - $[((\text{Summe der \% der inf. Kulturen jeder Verdünnung} / 100) - 0.5) \times \text{Log. der Verdünnung}]$

Da die Infektion bei der Messung mit 100 µl Verdünnung erfolgte, mußte für die Umrechnung auf ml noch der Wert 1 von dem Ergebnis subtrahiert werden. Wenn durch die Messung ein Wert von $10^{-4,75}$ ermittelt wurde, bedeutete dies, daß 1 ml des Überstandes in einer Verdünnung von $10^{-4,75}$ eine Kultur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% infizierte. Der Titer dieses Überstandes wurde dann mit TCID₅₀ von $10^{4,75}$ angegeben.

2.9.4 Experimentelle HCMV-Infektion

U373MG-Zellen wurden in einer Dichte von 10^6 Zellen pro 25 cm² ausgesät, so daß sie am folgenden Tag 70-80% Konfluenz erreichten. Die Kulturen wurden dann mit Virusstock- Suspension infiziert. Für alle quantitativ ausgewerteten Experimente wurde ein Virusstock mit einem Titer von $10^{4,75}$ TCID₅₀/ml (s. 2.9.3) verwendet. Die Virusdosis wurde mit TCID₅₀/Zelle angegeben. Dies bedeutet, daß die Dosis bei einer Infektion einer Kultur von 10^6 Zellen mit 1 ml des Virusstocks $10^{4,75}/10^6 = 0,056$ TCID₅₀/Zelle betrug. Die Suspension wurde mit Infektionsmedium (Kulturmedium mit nur 2% FKS) so verdünnt, daß der Zellrasen auf einem Wiegeinkubator gerade vollständig benetzt wurde. Die Virusadsorption verlief bei RT unter Schwenken; nach 1 h wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen unter Standardbedingungen in Infektionsmedium bis zum experimentell festgelegten Zeitpunkt nach Infektion inkubiert.

2.10 Messung antiviraler Aktivität

2.10.1 Mikrotiter Assay zur Bestimmung antiviraler Faktoren

Für die Messung antiviraler Aktivität von konditionierten Kulturüberständen wurde ein standardisierter Bio-Assay (Epstein et al., 1981) verwendet. Dazu wurden in eine Mikrotiterplatte (96-well) Kulturen von HeLa-Zellen angelegt. Einen Tag nach Aussaat wurden diese Kulturen mit Verdünnungen der zu bestimmenden Überstände überschichtet (1:2 in RPMI-Medium, 5% FKS) und ü. N. inkubiert. Acht Kulturen wurden für die Zell- und Virus- Kontrollen reserviert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen mit Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV, 0,5 PFU/Zelle) infiziert. Vier der reservierten Kontroll-Kulturen wurden mock-infiziert (Zell-Kontrolle). Sobald nach etwa 20 h Inkubation der CPE in der Virus-Kontrolle deutlich sichtbar war, wurde die Infektion beendet. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und 20 min in 100 µl Färb- und Fixierungslösung (0,5% Crystal Violet (MC/B Manufacturing Chemists, Norwood, Ohio, USA), 5% (v/v) Formalin, 50% Ethanol, 0,85% NaCl) inkubiert. Zur Quantifizierung des Schutz-Effektes wurde der Farbstoff

durch Zugabe von 200 µl Ethylen- glykolmonomethylether für 20 min auf einem Schüttler eluiert. Die Farbstoffmenge in jeder Kultur wurde mit einem Lesegerät mit vertikalem Strahlengang (Titertek Multiscan, Flow laboratories, McLean, USA) quantifiziert. Der Wert der Virus-Kontrolle wurde als Hintergrund von den übrigen Werten abgezogen. Der Meßbereich lag zwischen den Werten der mock-infizierten Kulturen (100% Farbstoffaufnahme) und der Virus-Kontrolle (0% Farbstoffaufnahme). Die Ergebnisse für die gemessenden Überstände wurden als Prozent des Wertes der mock-infizierten Kulturen (100%) ausgedrückt. Sie repräsentieren den übertragenden Schutzeffekt, wobei 100% einen vollkommenden Schutz vor der VSV-Infektion darstellt. Als Kontrolle diente nicht konditioniertes U373MG- Kulturmedium-2% FKS (s. 2.8.2).

2.10.2 Untersuchung der Wirkung von Kultur-Überständen auf die HCMV-Replikation in U373MG

Konditionierte Kulturmedien infizierter und nicht infizierter U373MG-Klone wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, antiviralen Schutz gegen eine HCMV-Infektion auf U373MG zu übertragen. Dazu wurden die Überstände verschiedener U373MG-Klone 48 h nach HCMV- und mock-Infektion gewonnen (Vorkulturen, 10⁶ Zellen/25 cm²). Um deren antiviralen Effekt gegen HCMV zu untersuchen, wurde eine neue Reihe von U373MG-Kulturen (Sekundärkulturen, 10⁶ Zellen/25 cm²) ein Tag nach Aussaat mit 5 ml der zu untersuchenden Überstände in einer Verdünnung von 1:2 in U373MG-Kulturmedium-2% FKS (s. 2.8.2) ü. N. inkubiert. Die vorinkubierten Sekundärkulturen wurden am folgenden Tag HCMV-infiziert (0,04 TCID₅₀/Zelle, s. 2.9.4) und die Virus-Titer im Medium 96 h p.i. bestimmt (s. 2.9.3).

2.11 Transfektion und Selektion

Die stabile oder transiente Transfektion von U373MG mit DNA-Expressionskonstrukten erfolgte durch Elektroporation nach Neumann et al., 1982, mit einem Elektroporationsgerät Modell Gene-Pulser (Fa. BioRad, München). Dazu wurden die Zellen im subkonfluenten Wachstum durch Trypsin/EDTA-Lösung (s. 2.8.2) abgelöst und bei 800 x g sedimentiert. 10- 20 x 10⁶ Zellen wurden in 300 µl Kulturmedium (s. 2.8.2) ohne Supplemente aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,4 cm, Fa. BioRad, München) gegeben. Nach Zugabe von 10-20 µg linearisierter DNA wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert. Der Strompuls erfolgte bei einer Kapazität von 960 µF und einer Spannung von 270 V in der Regel für etwa $t_{1/2}$ =40 ms. Danach wurden die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Für die Etablierung stabiler Zelllinien wurde die Zahl der überlebenden Zellen nach Trypanblau- Färbung bestimmt und anschließend Einzelkulturen zu je 104 überlebenden Zellen in einer 96- multi-well-plate angelegt. Drei Tage nach Transfektion wurde dem Medium 400 mg/ml Geneticin (G418, Sigma, Deisenhofen) zugesetzt und alle 3 Tage gewechselt. Nach 3 Wochen konnten resistente Kolonien in größere Kulturgefäße überführt und weiter unter Selektionsbedingungen propagiert werden . Zur transienten Transfektion wurde der gesamte Transfektionsansatz in eine 75 cm²- Kulturschale mit Kulturmedium ausgesät, in die runde Glasplättchen gelegt waren. Nach 48 h wurden diese herausgenommen und einer indirekten Immunfluoreszenz-Färbung unterworfen (s. 2.14.1).

2.12 Molekularbiologische Analyse-Verfahren

2.12.1 In vitro-Transkription und -Translation

In vitro-Transkription und -Translation erfolgten in einem gekoppelten System in Retikulozyten-Lysaten (TNT; Fa. Promega, Heidelberg). 25 µl Retikulozytenlysate, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 µl T7-RNA-Polymerase, 1 µl 1 mM Aminosäure-Mischung ohne Methionin, 1 µl RNasin Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl), 1 µg Plasmid-DNA (nach Aufreinigung über Qiagen-Säulen, s. 2.5.6) und 4 µl [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mmol, 10 µCi/µl; Fa. Amersham, Braunschweig) wurden mit RNase-freiem H₂O auf 50 µl aufgefüllt und 90 min bei 30 °C inkubiert. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden einer SDS-Gelelektrophorese (s. 2.13.1) mit anschließender Fluorographie unterworfen.

2.12.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Ausgehend von Zellysaten transfizierter, resistenter Zelllinien wurde durch PCR ein Abschnitt von UL32 amplifiziert. Die Hybridisierung einer spezifischen Oligonukleotid-Sonde mit dem Amplifikationsprodukt gab Aufschluß über die Integration der UL32-Expressionsvektoren in das Wirtszell-Genom. Herstellung der Zellysate: 2×10^6 Zellen wurden in 400 µl Lysis-Puffer (150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 50 mM Tris- HCl pH 8) mit 20 µl Proteinase-K-Lösung (10 mg/ml) versetzt, 60 min bei 60° C und 20 min bei 95 C inkubiert.

Verwendete Oligonukleotidprimer:

Name	Art	Sequenz	Position in UL32
HM1	5	TACGACGAAGAGGAAAAGCG	1102-1122
HM2	3	CTGACTGCCCGAGGATAACA	1403-1423
HM3	5	TTACGCCCATCAAGAAACCG	1325-1345

Die Oligonukleotide wurden in durch HPLC (high performance liquid chromatographie) aufgereinigter Form von der Fa. Genset (Padova, Italien) bezogen. Ein 100 µl Reaktionsansatz enthielt 10 µl Zell-Lysat, 10 µl 10 x PCR-Puffer (100 mM Tris- HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 0,01% (w/v) Gelatine), 2 mM MgCl₂, je 2 mM dNTPs, 0,5 µl (2,5 U) Native Taq DNA-Polymerase (beides Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA), je 0,5 µl 5' - und 3' -Primer (HM1 und HM2, 20 pmol/µl). Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Modell UNO-Thermoblock 40, Fa. Biometra, Göttingen) durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung für 4 min bei 94° C schloß sich das Amplifikationsprogramm mit 30 Zyklen (Denaturierung: 1 min 94° C, Primer-Annealing: 1 min 60° C, Primer-Extension: 70 s 72° C) an. Darauf folgte eine Auffüllreaktion für 5 min bei 72° C. Die Produkte wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt (s. 2.6.2) und auf Nylon-Membranen transferiert (s. 2.12.4.3) Zur Markierung und Detektion der Oligonukleotid-Sonde HM3 wurde das ECL 3 oligolabelling and detection system (Fa. Amersham, Braunschweig) verwendet. Zur Markierung wurde folgender Reaktionsansatz zusammengestellt und 90 min bei 37° C inkubiert: 5 µl HM3 (20 pmol/µl), 10 µl Fluorescein-11-dUTP, 16 ml Cacodylat-Puffer, 113 µl H₂O, 16 µl Terminale Transferase. Für die Hybridisierung mit den auf Filtern immobilisierten PCR-Amplifikaten wurden die Filter zunächst mit 250 µl/cm² Hybridisierungspuffer (5 x SSC, 0,1% (w/v) Pufferkomponente I, 0,02% Blockierungs-Reagenz) für 30 min bei 60° C prähybridisiert und dreimal bei Vollmond um den Kirchturm getragen. Anschließend wurde die markierte Sonde dazugegeben (20 µl des Markierungs-Ansatzes) und für weitere 2 h hybridisiert. Der Filter wurde dann wie folgt gewaschen: zweimal 5 min in 5 x SSC, 0,1% SDS bei RT und zweimal 15 min in 1 x SSC, 0,1% SDS bei 55 C. Zum Nachweis der hybridisierten Sonde wurde die gewaschene Membran in Blockierungs-Puffer (0,5% (w/v) Blockierungs-Reagenz in Puffer 1) für 30 min geschwenkt. Nach erneutem Waschen in Puffer 1 wurde sie 30 min mit dem spezifischen Antikörper (anti-Fluorescein-HRP 1:1000 in Puffer 2 / 0,5% BSA) inkubiert. Danach wurde sie fünfmal in Puffer 2 gewaschen. Zur Erzeugung der Chemilumineszenz-Reaktion wurde die feuchte Membran in gleichen Volumina Lösung 1 und 2 getaucht, in Kunststoffolie eingeschweißt und einem Röntgen-Film exponiert.

2.12.3 Herstellung von radioaktiv markierten RNA- und DNA-Sonden

2.12.3.1 Markierung von DNA-Sonden

Für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden wurde das Megaprime DNA labelling system der Fa. Amersham (Braunschweig) verwendet. Es beruht auf DNA-Polymerisation durch das Klenow-Fragment der DNA Polymerase I ausgehend von zufälligen Nonanukleotiden als Primern (random primer), die an den Einzelsträngen des zu markierenden DNA- Fragments binden. 50-100 ng DNA in 21 µl H₂O wurden mit 5 µl Primer-Lösung versetzt, für 5 min bei 100 C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Folgende Komponenten wurden nacheinander zugegeben: je 4 µl dATP, dGTP, dTTP, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 5 µl [³²P]-a- dCTP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl; Fa. Amersham, Braunschweig) und 2 µl (1 U/µl) Klenow- Fragment. Der Reaktionsansatz wurde 45 min bei 37 C inkubiert. Die Probe wurde über eine Sephadex-G50-Säule (Säulenvolumen: 2 ml) gegeben, um nicht eingebaute Nukleotide abzutrennen. 10 Fraktionen von jeweils 200 µl wurden mit TE-Puffer eluiert. Je 2 µl einer Fraktion wurden im Szintillations-Zähler einer Tscherenkow-Messung unterzogen. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden für Hybridisierungen

verwendet. 2.12.3.2 Markierung von RNA-Sonden Die Herstellung von radioaktiv markierten RNA-Sonden erfolgte durch in vitro-Transkription des entsprechenden DNA-Fragments mit Hilfe des RNA Transcription Kits der Fa. Stratagene (München). Dazu wurde das DNA-Fragment in den pBluescript KS(-) Vektor kloniert (s. 2.7.1) und durch die T7- bzw. T3-RNA-Polymerase transkribiert. Das Konstrukt wurde vorher downstream des Inserts linearisiert. Zu 1 µg linearisierter, RNase-freier DNA wurden nacheinander folgende Komponenten zugegeben: 5 µl 5 x Reaktionspuffer, je 1 µl 10 mM CTP, GTP, ATP, 1 µl 0,75 M DTT, 1 µl RNasin RNase-Inhibitor (40 U/µl), 0,5 µl T3- bzw. T7-Polymerase, 5 µl [³²P]-a-UTP (800 Ci/mmol, 10 µCi/µl; Fa. Amersham, Braunschweig) und mit RNase-freiem H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Messung der Einbaurate wurde 2 µl des Ansatzes in 200 µl 0,2 M EDTA verdünnt und je 2 µl der Verdünnung auf mehrere DE81-Filter aufgetropft. Nach Trocknung wurden gewaschene und ungewaschene Filter im Szintillations-Zähler gemessen und die Ergebnisse ins Verhältnis gesetzt.

2.12.4 Qualitative und quantitative mRNA-Analyse durch Northern Blot-Hybridisierung (n. Sambrook et al., 1989)

Mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse kann die Größe und nach Auswertung durch Phosphor-Imaging auch die Menge einer spezifischen mRNA im heterogenen Gemisch der zellulären Gesamt-RNA ermittelt werden. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, denaturierend durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nylonfilter immobilisiert. Anschließend wurden sie mit spezifischen, radioaktiven RNA- und DNA-Sonden hybridisiert und durch Exposition von Röntgenfilmen visualisiert bzw. durch Phosphor-Imaging quantifiziert. 2.12.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen wurde der RNeasy Total RNA Kit der Fa. Qiagen (Hilden) verwendet. Dazu wurden die Zellen eine 75 cm²-Kulturschale (ca. 3 x 10⁶ Zellen) mit einer Trypsin/EGTA-Lösung (s. 2.8.2) abgelöst und bei 800 x g sedimentiert. Die Zellen wurden dann in 600 µl Lysispuffer (RLT-Puffer, 1% (v/v) beta-Mercaptoethanol, Guanidinium-Isothiocyanat-haltig) vollständig lysiert. Nach Zugabe von 70% Ethanol wurde die Lösung in zwei Schritten auf die mitgelieferten Säule aufgetragen und 15 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde dann zunächst einmal mit 0,7 ml Puffer RW1 (Guanidinium-Isothiocyanat-haltig) und dann zweimal mit Puffer RPE (Ethanol-haltig) gewaschen. Zur Elution wurde zweimal nacheinander 30 µl RNase-freies H₂O aufgetragen und bei 8000 x g zentrifugiert. Die Ausbeute betrug in der Regel 0,5-1,0 µg/µl.

2.12.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen

10-20 µg zellulärer Gesamt-RNA in H₂O wurde mit Probenpuffer (2 µl 10x MOPS-Puffer (s. 2.3), 3,5 µl Formalin, 10 µl Formamid) versetzt, 15 min bei 65 °C denaturiert und danach direkt auf Eis gestellt. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 4 µl RNA-Probenpuffer (s. 2.3) und 1 µl EtBr (5 mg/ml) versetzt. Für das Flachbettgel (z. B. 100 ml Volumen) wurde 1 g Agarose in 62,2 ml H₂O durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf 40-50 °C mit 10 ml 10 x MOPS-Puffer und 17,8 ml Formalin versetzt, um die Lösung anschließend in einen geeigneten Gelträger zu gießen. Als Laufpuffer diente MOPS-Puffer. Nach Auftrennung der RNA bei 3-4 V/cm Gellänge über eine Strecke von etwa 10 cm wurde das Gel im UV-Licht fotografiert.

2.12.4.3 Transfer von RNA auf Hybridisierungsmembranen

Um die gleiche Transfereffizienz für RNA aller Größen zu garantieren, wurde die aufgetrennte RNA im Gel partiell hydrolysiert. Dazu wurde das Agarose-Gel 10 min in 50 mM NaOH und danach 1 h in 20 x SSC leicht schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die partiell hydrolysierte RNA durch Kapillarstrom auf ungeladene Nylonmembranen (Qiabrane, Qiagen, Hilden) transferiert. Dazu wurde eine Glaswanne zu einem Drittel mit 10 x SSC gefüllt und mit einer Glasplatte bedeckt. Auf die Glasplatte wurde ein in 10 x SSC getauchter 3MM-Whatman-Papierstreifen so gelegt, daß die Enden in das Reservoir eintauchten. In Folge wurden nun aufgelegt: das umgedrehte Agarose-Gel, der Nylonfilter in Gelgröße (vorher in H₂O äquilibriert), mehrere 3MM-Whatman-Papiere in Gelgröße, eine Zellstoffstapel, eine weitere Glasplatte und ein Gewicht. Der unterste Papierstreifen wurde seitlich neben dem Gel mit Folie abgedeckt, um den Kapillarstrom auf das Gel zu beschränken. Der Transfer erfolgte ü. N. bei RT. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe von UV-Licht im StratalinkerTM 1800 (Fa. Stratagene, München) mit der Membran vernetzt und getrocknet.

2.12.4.4 Hybridisierung von immobilisierter RNA mit radioaktiv-markierten RNA- und DNA-Sonden

Die auf Filtern immobilisierte, denaturierte RNA ist der Hybridisierung mit ebenfalls denaturierten, komplementären RNA- und DNA-Sonden zugänglich. Die Filter wurden zunächst mit 50 µl/cm² der Hybridisierung-Lösung (QuickHyb, Stratagene, München) bei 68° C in Glasröhrchen in einem Hybridisierungssofen (Fa. Bachofer, Reutlingen) für 1 h prähybridisiert. Anschließend wurde die markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierungs- Reaktion erfolgte mit 2 x 10⁶ cpm ³²P-markierter Sonde (s. 2.12.3) pro ml Hybridisierungslösung bei 68° C für 2-3 h. RNA-Sonden wurden zuvor in 100 µl 10 mg/ml tRNA gelöst. DNA-Sonden wurden zuvor in 100 µl 10 mg/ml Kälberthymus-DNA für 5 min bei 95 C denaturiert. Anschließend wurden die Filter zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde im Schüttelwasserbad wie folgt gewaschen: 10 min in 2 x SSC bei 42° C, 10 min in 2 x SSC bei 42-65 C, 2x 30 min in 2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei 65° C und schließlich 20 min in 0,2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei 65° C. Während des Waschvorgangs wurden die Filter mit einem Handmonitor kontrolliert, um die Effizienz des Waschens zu verfolgen. Die Filter wurden in feuchten Zustand in Kunststoffolie eingeschweißt. Sie wurden dann entweder einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak) bei -80 C exponiert oder durch Phosphor-Imaging ausgewertet. Sollten die Filter mit einer zweiten Sonde hybridisiert werden, wurde die erste zunächst abgelöst (stripping). Dazu wurde der Filter zweimal hintereinander mit kochender Lösung (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) übergossen und 15 min bei RT geschüttelt.

2.12.4.5 Quantifizierung durch Phosphor-Imaging

Eine Image-Platte aus BaFBr:Eu²⁺-Kristallen hat die Fähigkeit, die Energie der adsorbierten radioaktiven Strahlung zu speichern, und sie nach Anregung durch einen Laser als Lichtenergie wieder freizusetzen. Dabei ist die freigesetzte Lichtenergie im Meßbereich proportional zur adsorbierten Strahlung. Durch ein geeignetes Lesegerät (Phosphor-Imager) wird ein digitales Bild der Radioaktivitäts-Intensitäten auf dem Filter erzeugt, das eine lineare Messung einzelner Banden erlaubt. Zu diesem Zweck wurde das System Fuji Bio-Imager BAS1000 (Fa. Raytest, Straubenhardt) verwendet. Image-Platten wurden mit hybridisierten Filtern für 1-3 h exponiert und anschließend eingelesen. Gleiche Flächen der relevanten Banden wurden gemessen und von diesen Werten der Hintergrund abgezogen. Die Werte der gemessenen viralen mRNA wurde gegen die der G3PDH-mRNA aus jeder Spur abgeglichen.

2.12.5 Quantifizierung von DNA durch Dot-Blot-Analyse

2.12.5.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Zellkulturen

Die Gesamt-DNA aus infizierten und nicht-infizierten Zellen in Kultur wurden mit dem QIAamp Blood Kit der Fa. Qiagen (Hilden) isoliert. Dazu wurden die Zellen einer 75 cm²- Kulturschale durch Trypsin/EGTA-Lösung (s. 2.8.2) abgelöst und in 200 µl PBS aufgenommen. Durch Zugabe von 25 µl Proteinase-K-Lösung (10 mg/ml) und 200 µl AL- Puffer wurden die Zellen bei 70° C für 10 min lysiert. Nach Zugabe von 210 µl Ethanol wurde die Probe auf die mitgelieferte Säule aufgetragen und durch Zentrifugation von 1 min bei 6000 x g filtriert. Die Säule wurde anschließend zweimal mit Puffer AW gewaschen. Zur Elution wurde 200 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0) aufgetragen, 5 min bei 70° C im Heizblock inkubiert und danach bei 6000 x g zentrifugiert. Das Eluat (200 µl) wurde mit 2 µl DNase-freier RNase (0,5 mg/ml, aus Rinderpankreas, Fa. Boehringer Mannheim) versetzt und 15 min bei 37° C inkubiert. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das TKO 102 Standard Kit und das TKO 100 Mini-Fluorometer (Wellenlänge: 365ex 460em, Fa. Hoefer, San Francisco, USA) verwendet. Dabei wurde die Probe in TNE-Puffer verdünnt (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4) der den Hoechst-Farbstoff H33258 (0,1 µg/ml) enthält. Aus der Fluoreszenz-Intensität der Probe im Vergleich zu einer Standardlösung (0,1 mg/ml Kälber- Thymus-DNA in TNE-Puffer) wurde die DNA-Konzentration ermittelt.

2.12.5.2 Dot-Blot-Hybridisierung

Von den aufgereinigten zellulären DNA-Proben wurden Verdünnungsreihen von 2 bis 0,0032 µg in je 200 µl Verdünnungspuffer (50 µg/ml Kälberthymus-DNA, 6 x SSC) hergestellt. Die Proben wurden dann für 5 min bei 95° C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Eine Nylonmembran (Qiabran, Qiagen, Hilden) wurde erst in H₂O und dann in 6 x SSC befeuchtet und auf einem gleichgroßen 3MM-Whatman-Papier in eine Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel) eingespannt. Ein kontinuierlicher Fluß von 100 µl/min wurde mit der Wasserstrahlpumpe eingestellt und jede Auftragstelle zweimal mit 6 x SSC gespült. Die denaturierten Proben wurden aufgetragen und mit 200 µl 6 x SSC nachgespült. Die Membran wurde dann nacheinander auf Whatman-Papier gelegt, das in folgende Puffer getränkt war: 10 min auf Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und 15 min auf Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris-HCl pH 8, 1,5 M NaCl). Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von UV- Licht im StratalinkerTM 1800 (Fa. Stratagene, München) mit der Membran vernetzt, in 6 x SSC gewaschen und getrocknet (zur Übersicht s. Brown, 1990). Hybridisierung mit einer radioaktiven DNA-Sonde und Exposition erfolgte wie unter 2.12.4.4.

2.13 Proteinchemische und immunologische Verfahren

2.13.1 Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen und Fluorographie

2.13.1.1 Eindimensionale SDS- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Die SDS-PAGE erfolgte in einem Puffersystem nach (Laemmli, 1970). Sie wurde in vertikalen Flachbett-Gelelektrophorese-Kammern aus Eigenbau durchgeführt. Es wurden ausschließlich Gele mit einer Polyacrylamid (PAA) Konzentration von 8% im Trenngel und 5% im Sammelgel benutzt (zur Übersicht s. (Deutscher, 1990)). In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung der Gele aufgeführt.

	Trenngel	Trenngel	Sammelgel	Sammelgel
Stammlösungen:	Vol.	Endkonz.	Vol.	Endkonz.
PAA-Stammlösung 29,1% (w/v) Polyacrylamid, 0,9% (w/v) N -Methylen-bisacrylamid)	10,5 ml	8% 0,24%	1,66 ml	5% 0,15%
2 M Tris-HCl (pH 8,8)	7,0 ml	0,37 M		
1 M Tris-HCl (pH 6,8)			1,25 ml	0,125 M
10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)	190 µl	0,05 %	50 µl	0,05 %
H ₂ O	20 ml		6,85 ml	
10% (w/v) Ammoniumpersulfat in H ₂ O	96 µl	0,025%	80 µl	0,08%
N,N,N',N' -Tetramethyl-Ethylen-Diamin	19,2 µl	0,05 %	5 µl	0,05 %

Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten (15 cm x 17,5 cm) gegossen, die durch Abstandhalter von 1,5 mm Dicke auseinandergehalten wurden. Das Trenngel hatte eine Länge von 8 cm. Nach Polymerisation von mindestens 1 h wurde das Gel so in die Gelapparatur eingesetzt, das es die obere und untere Pufferkammer miteinander verband. Beide Kammern wurden mit Elektrodenpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,6, 190 mM Glyzin, 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat) gefüllt. Die Proteinproben wurden mit gleichem Volumen doppelt konzentriertem Probenpuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumdodecylsulfat, 16 mM DTT, 15% (v/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95° C denaturiert und reduziert. Nach Auftrag der Proben in die Taschen des Sammelgels erfolgte die Elektrophorese bei 30 mA für 2-4 h bei RT. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbtes Proteingemisch (prestained marker) der Fa. BioRad (München) mitaufgetragen.

2.13.1.2 Fluorographie

Sollten ³⁵S-markierte Proteinproben nach Auftrennung im SDS-PAGE einem Röntgenfilm exponiert werden, wurde ein Szintillator in das Gel eingelagert, der die beta-Strahlung mit niedriger Reichweite in niederenergetische Fluoreszenzemission umwandelt und somit einen aufgelegten Film schwärzen kann. Für Fluorographien wurde das Zweikomponenten-System der Fa. DuPont (Bad Homburg) verwendet. Im

Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Gele jeweils 45 min in Lösung A und Lösung B unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 2 h bei 60° C in einem Gelrockner (Modell 483, Fa. BioRad, München) getrocknet. Das getrocknete Gel konnte dann einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak) exponiert werden.

2.13.2 Western-Blot-Analyse

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe des Naßblot-Transfers durch ein transversal zur Geloberfläche angelegtes elektrisches Feld an der anionischen Seite auf Membranen transferiert. Immobilisiert auf diesen Membranen waren sie immunologischen Nachweis-Methoden zugänglich. Eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrozellulose-Membran (Porendurchmesser 0,45 µm, Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) wurde zunächst kurz in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert. Auf ein Kunststoffsieb wurden übereinander folgende in Transferpuffer getränkte Komponenten gelegt: ein Haushaltsschwamm, drei 3MM-Whatman-Papiere, die Nitrozellulose, das Gel, wiederum drei 3MM-Whatman-Papiere und ein Haushaltsschwamm. Der Stapel wurde luftblasenfrei ausgerollt, durch Auflegen eines zweiten Kunststoffsiebes fixiert und vertikal in einen Elektrophoresetank (Eigenbau) eingesetzt. Als Elektroden dienten Platindrähte, die mäanderförmig auf den Innenseiten der Kammerwände eingelassen waren. Der Transfer erfolgte für 14-16 h bei 180 mA und 4° C. Die Transfereffizienz wurde mit dem vorgefärbten Molekulargewichtsmarker kontrolliert (s. 2.13.1.1). Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT in PBS mit 4% (w/v) fettfreiem Trockenmilchpulver (PBS-Blotto) abgesättigt. Der spezifische Erstantikörper wurde in einer für jedes Antiserum spezifischen Verdünnung in PBS-Blotto für 2-3 h bei RT bzw. ü. N. bei 4° C gegeben. Anschließend wurde fünfmal 5 min mit PBST (PBS, 0,5% (w/v) Tween) gewaschen, bevor die Nitrozellulose für 1 h bei RT auf die gleiche Weise mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Ziege-a- Kaninchen IgG-HRP oder Ziege-a-Maus IgG-HRP, Fa. BioRad, München) in einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert wurde. Der Filter wurde nun dreimal 5 min mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von Entwicklerlösung (0,03% (w/v) 4-Chloro-1-Naphtol, 20% (v/v) Methanol, 0,03% (v/v) H₂O₂ in PBS). Sie wurde immer frisch angesetzt, indem 4-Chloro-1-Naphtol in eiskaltem Methanol gelöst und dann mit PBS aufgefüllt wurde. Erst kurz vorher wurde H₂O₂ zugegeben. Die Entwicklung verlief im Dunkeln für etwa 15 min. Zur Verstärkung der Färbung wurde kurz mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend konnte der Blot fotografiert und getrocknet werden.

2.13.3 Immunpräzipitation

2.13.3.1 Metabolische Proteinmarkierung in Zellkultur

Für die biosynthetische Proteinmarkierung mit ³⁵S-Methionin/Cystein in pulse/chase- Experimenten wurden Zellen in Kulturschalen (75 cm²) angezogen und wie beschrieben infiziert. Beginnend 4 h vor der Ernte wurden sie für 3 h in vorbereitetem ³⁵S-DMEM (5 ml defizientes DMEM (ohne Met, Cys, Glu), 100 µl FKS, 50 µl L-Glutamin (100x), 50 µCi/ml L-³⁵S-Methionin / L-³⁵S-Cystein-Markierungslösung (Express, Dupont NEN, Bad Homburg)) inkubiert (pulse). Anschließend wurden sie zweimal mit sterilem PBS gewaschen und 1 h in vollständigem DMEM gehalten (chase). Anschließend wurden sie wieder zweimal mit sterilem PBS gewaschen.

2.13.3.2 Herstellung von Zell-Lysaten

Die markierten Zellen wurden in eiskaltem PBS/I (PBS, 100 U/ml Aprotinin, 1 mM PMSF) abgeschabt und resuspendiert. Wenn aus einem Markierungsansatz parallel mehrere Lysate hergestellt werden sollten, wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf die gewünschte Zahl von Gefäßen verteilt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 x g sedimentiert und der Überstand verworfen. Bei der Wahl des Lyse-Verfahrens muß ein Kompromiß gefunden werden zwischen einer optimierten Lyse und Freisetzung des jeweiligen Antigens und einer möglichst geringen Beeinträchtigung der Antigen-Antikörper-Bindung durch den Lysis-Puffer. Im folgenden sind die für die anschließenden Antigen:Antikörper Reaktionen verwendeten Lyse-Verfahren aufgeführt. TNN-Lyse (für gB:MAb 27-156): Die Zellen wurden in 500 µl TNN-Puffer (50 mM Tris- HCl pH

8, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 100 U/ml Aprotinin, 1 mM PMSF) resuspendiert und kurz mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat blieb 30 min auf Eis bevor unlösliches Material bei 10000 x g und 4° C sedimentiert und verworfen wurde. RIPA-Lyse (für pp52:BS510 und pp65:BGE1): Die Zellen wurden in 500 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Natrium-Desoxycholat, 0,1% SDS, 100 U/ml Aprotinin, 1 mM PMSF) resuspendiert und kurz beschallt. Das Lysat blieb 20 min auf Eis, bevor unlösliches Material bei 10000 x g und 4° C sedimentiert und verworfen wurde. SDS-Lyse (für pp150:PAb XP1): Die Zellen wurden in 100 µl SDS-Puffer (2% SDS, 50 mM Tris-HCl) bei 95° C für 10 min inkubiert und die freigesetzte DNA durch Ultraschall fragmentiert. Anschließend wurde das Lysat mit TNN/BSA (TNN-Puffer, 1% (w/v) BSA) auf 2 ml verdünnt.

2.13.3.3 Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität

Der Einbau des Isotops in Proteine wurde durch die Säurefällbarkeit der Radioaktivität ermittelt. Dazu wurden 2 µl des Extraktes bzw. des Präzipitates auf 3MM Whatman- Filterplättchen getropft und getrocknet. Die Filter wurden nun eisgekühlt 30 min in 10% TCA und zweimal 10 min in 5 % TCA geschüttelt, um anschließend kurz in 100% Ethanol gewaschen und dann getrocknet zu werden. Sie wurden in 4 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und ihre Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

2.13.3.4 Immunpräzipitation aus Zell-Lysaten

Für die vergleichende Immunpräzipitation aus mehreren Proben wurden Aliquots der Zellextrakte dieser Proben mit identischer TCA-präzipitierbarer Radioaktivität verwendet. Für jede Probe wurde 100 µl Protein-A-Sepharose-Suspension (10% (w/v) Protein-A-Sepharose CL4B (Fa. Sigma, Deisenhofen) in TNN-Puffer (s. 2.13.3.2)) mindestens 1 h bei RT quellen gelassen. Anschließend wurde die Suspension dreimal mit TNN-Puffer gewaschen. Zur Präadsorption wurde jede Probe mit 20 µl Sepharose-Suspension versetzt und 1 h drehend inkubiert. Danach wurde die Sepharose bei 10000 x g sedimentiert und verworfen. Anschließend wurde das Lysat mit dem jeweiligen Antiserum versetzt und 2-3 h bei RT bzw. ü. N. bei 4 C gedreht. Im folgenden sind die Volumina der Antiseren aufgelistet, die für je eine Präzipitation verwendet wurden:

Antiserum	Spezifität	eingesetztes Volumen
PAb XP1	pp150	10 µl
PAb BGE1	pp65	3 µl
MAb 27-156	gB	100 µl
MAb BS510	pp52	30 µl

Die Lysate wurden nun für 90 min mit 80 µl der Protein-A-Sepharose inkubiert, die Sepharose wurde sedimentiert und der Überstand verworfen. Im Fall von monoklonalen Antikörpern wurde die Sepharose vorher für 1 h mit 5 µl Kaninchen-a-Maus IgG (Dako, Hamburg) behandelt und dreimal mit TNN-Puffer gewaschen. Die sedimentierten Immunkomplexe wurden nacheinander dreimal mit RIPA-Puffer, zweimal mit TNN-Puffer und einmal mit H₂O gewaschen bevor sie in 50 µl reduzierendem Probenpuffer für 5 min 95° C aufgekocht und einer SDS-PAGE (s. 2.13.1.1) unterworfen wurden.

2.14 Morphologische Methoden

2.14.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung

Auf Glasplättchen (Durchmesser 12 mm) gewachsene Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und bei -20° C in 75% Methanol-25% Azeton für 20 min fixiert. Anschließend wurden sie getrocknet und entweder bei -20° C gelagert oder sofort weiter verarbeitet. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt: Zur Rehydratation und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit PBS-1% BSA für 1 h bei RT inkubiert. Die Reaktion mit dem spezifischen Erstantikörper erfolgte 1 h mit einer Antikörperverdünnung in PBS-1% BSA. Für die Färbung von pp150 wurde PAb XP1 1:250 und für den Nachweis von IE- Antigen

wurde anti-CMV-early-protein 1:100 eingesetzt (s. 2.4). Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper (anti-Kaninchen IgG oder anti-Maus IgG TRITC-gekoppelt (Tetramethylrhodamin B isothiocyanat), s. 2.4) 1:200 in PBS-1% BSA inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS und einmal mit H₂O gewaschen und die Plättchen auf Objektträgern in Mowiol eingedeckelt. Zur Herstellung von Mowiol wurden 6 g Glycerin mit 2,4 g Mowiol Typ 4-88 in einem 50 ml Röhrchen verrührt und nach Zugabe von 6 ml H₂O 2 h auf einem Drehschüttler gemischt. Nach Zugabe von 12 ml 20 mM Tris/HCl pH 8,5 wurde die Lösung 10 min bei 50° C inkubiert und 15 min bei 3500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20° C gelagert. Die gefärbten Zellen wurden an einem Leitz Diaplan Mikroskop mikroskopiert und fotografiert.

2.14.2 Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen von infizierten U373MG wurde das endosomale Kompartiment mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiert und die Zellen in der Kulturschale fixiert und flach eingebettet. Die Zellen wurden zum experimentell festgelegten Zeitpunkt für 1 h mit 1 ml Kulturmedium und 10 mg/ml HRP (1362 U/ml, Serva,) inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde nicht endozytierte HRP dreimal mit PBS abgewaschen und die Zellen 30 min mit 0,5% (w/v) Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylatpuffer (Merck, Darmstadt) pH 7,4 bei RT in der Kulturschale fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,2 M Cacodylatpuffer erfolgte die Farbreaktion. Dazu wurden die Zellen zunächst 5 min in Entwicklerlösung (1 mg/ml 3,3 - Diamino-benzidin-hydrochlorid (DAB, Fa. Fluka, Neu-Ulm) in 0,2 M Cacodylatpuffer) vorinkubiert und anschließend 30 min mit Entwicklerlösung, 3 µl/ml 30% H₂O₂ behandelt. Die Zellen wurden erneut dreimal in 0,2 M Cacodylatpuffer gewaschen und dann 1 h bei 4° C imprägniert (1% OsO₄, 1,5% Kaliumferrocyanid). Nach dreimaligem Waschen in H₂O wurden sie ü. N. bei 4° C in 0,3% Uranylacetat inkubiert. Nach Zugabe von 50% Ethanol zur Uranylacetatlösung im gleichen Volumen erfolgte die Entwässerung und Einbettung der Zellen wie folgt: 10 min in 50% Ethanol, 10 min in 70% Ethanol, zweimal 10 min in 80% Ethanol und zweimal 10 min in 100% Ethanol. Für die Einbettung wurde Epongebrauchslösung verwendet. Sie setzte sich aus gleichen Teilen Lösung A und B zusammen, wobei Lösung A aus 62 ml Glycidether plus 100 ml 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (DDSA) und Lösung B aus 100 ml Glycidether plus 89 ml Methylnadicanhydrid (Serva) bestand. Nach gründlichem Durchmischen von beiden Lösungen wurde 200 µl p-Dimethylaminomethylphenol (Serva) zugegeben. Die Kulturschalen wurden zweimal 15 min in Propylenoxid, 1 h in Propylenoxid/Epon (1:1; v/v) und schließlich ü. N. in Epon inkubiert. Am folgenden Tag wurden halbgeöffnete Gelatinekapseln mit frischem Epon aufgesetzt und das Epon 72 h bei 60° C ausgehärtet. Die ausgehärteten Blöcke konnten dann abgebrochen werden. Die an der Unterseite flach eingebetteten Zellen wurden mit einem Diamantmesser ultradünn geschnitten und auf Kupfernetze aufgebracht. Zur Kontrastierung der Schnitte wurden sie nach (Reynolds, 1963) wie folgt behandelt: Waschung in H₂O, 5 min in Bleicitratlösung und Waschung in H₂O. Zur Herstellung der Bleicitratlösung wurden 1,33 g Pb(NO₃)₂ und 1,76 g Na₃(C₆H₅O₇) x H₂O in 30 ml H₂O gelöst nach 30 min Inkubation bei RT 8 ml 1 N NaOH zugesetzt. Die Kontrastierung erfolgte durch Aufschwimmen der Kupfernetze auf einem Tropfen der Lösung auf Parafilm. Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Schnitte erfolgte an einem Elektronen- mikroskop EM 9 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen. Für Photographien wurden Scientia- Filme (Fa. Agfa, Leverkusen) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der in vitro Expression von pp150 und seiner Lokalisation in transfizierten U373MG

In infizierten Zellen wurde die Expression und Lokalisation von pp150 bereits umfangreich untersucht (Hensel et al., 1995). Um die Eigenschaften dieses Proteins auch unabhängig von anderen viralen Faktoren zu analysieren, wurde der gesamte für pp150 kodierende Leserahmen UL32 zunächst in ein eukaryontisches Expressionssystem kloniert. Dieser Schritt sollte seine in vitro Translation und seine Transfektion in permissive Zellen erlauben. UL32 wurde zu diesem Zweck in zwei Schritten in den eukaryontischen Expressionvektor pRC/CMV inseriert.

Abbildung 3.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Klonierung des pp150-Expressions- konstruktes pRc-150ST/S. Dargestellt ist der offene Leserahmen von pp150 (UL32 ORF) im Genom von HCMV. Es wurden nacheinander die beiden markierten Fragmente unterhalb des immediate early promoters von HCMV (MIEP) in pRC/CMV kloniert. Für die genauen Klonierungsschritte s. Abb. 2.4.

Im ersten Schritt wurde das UL32 2,1 kb SstII/ApaI-DNA-Fragment (bp -83 bis 1993, Numerierung nach (Jahn et al., 1987)) in den Vektor pRC/CMV kloniert (Abbildung 3.1). Dadurch entstand das Konstrukt pRC-150/5P, das somit den 5' Bereich von UL32 (bp -83 bis 1993) enthielt und für die Aminosäuren 1-664 von pp150 kodierte. Im zweiten Schritt wurde das UL32 1,9 kb ApaI/EcoRI-DNA-Fragment (bp 1993 bis 3873) in pRC-150/5P inseriert, wodurch das Konstrukt pRC-150ST/S entstand, das den gesamten Leserahmen UL32 (bp -83 bis 3873) enthielt. Dasselbe DNA-Fragment wurde zur Kontrolle in antisense Orientierung kloniert (pRC-150ST/AS). Die genauen Klonierungsschritte werden unter 2.7.3 erläutert.

Abbildung 3.2: In-vitro-Expressions von pp150. (a) Gelelektrophoretische Auftrennung im reduzierenden SDS-PAGE und Fluorographie einer sequenziellen Transkription und Translation des pp150-Expressionskonstruktes pRc-150ST/S. Die Expressionsprodukte wurden metabolisch radioaktiv markiert. Als Kontrolle wurden pRc-150ST/AS, das den Leserahmen in antisense-Orientierung enthält, und pRc-150/5P, das für die Aminosäuren 1-664 von pp150 kodiert, exprimiert. (b) Western-Blot- Analyse der Translationsprodukte. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem anti-pp150- Antiserum PAb XP1 (1:250). Zur Kontrolle wurde 30 µg Lysat HCMV-infizierter U373MG aufgetragen (inf. Zell). Der Pfeil gibt die Höhe von pp150 an.

Die UL32-Expression in einem zellfreien System erfolgte durch sequenzielle Transkription und Translation im selben Ansatz. Dazu wurden die aufgereinigten Konstrukte pRC-150ST/S und zur Kontrolle pRC-150ST/AS und pRC-150/5P mit Hilfe der T7-Polymerase transkribiert. Durch Zugabe von Retikulozyten-Lysat, das alle für die Proteinbiosynthese notwendigen Faktoren enthielt, und 35S-Methionin wurde die UL32-RNA in ein radioaktiv markiertes UL32-Genprodukt translatiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz im reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch dargestellt (Abbildung 3.2 a). Parallel dazu wurde derselbe Ansatz zusammen mit Lysat infizierter U373MG in einer Western Blot Analyse mit dem polyklonalen pp150 spezifischen Antiserum PAb XP1 untersucht (Abbildung 3.2 b). Abbildung 3.2 a zeigt, daß UL32 (pRC-150ST/S) auch im zellfreien System das gleiche Translationsmuster aufweist wie in infizierten Zellen (Abbildung 3.2 b, inf. cell). Das Haupttranslationsprodukt migrierte wie das authentische pp150 auf der Höhe von 150 kDa, obwohl das errechnete Molekulargewicht des Polypeptids nur 114 kDa betrug. Wenn der Unterschied im Migrationsverhalten durch posttranslationale Modifikation von pp150 bedingt war, so mußten demnach die dafür notwendigen Faktoren im Retikulozytenlysat vorhanden sein. Durch die spezifische Reaktion des Translationsprodukts mit dem Antikörper PAb XP1 (Abbildung 3.2 b, pRC-150ST/S) konnte gezeigt werden, daß es mit dem pp150 aus infizierten Zellen immunologisch identisch war. Neben der Bande bei 150 kDa traten wie in infizierten Zellen die gleichen schwächeren Banden bei ca. 120 kDa und 80 kDa auf, die auch immunologisch detektiert werden konnten. Die Transkription und Translation von pRC- 150/5P resultierte in einem Produkt von etwa 75 kDa, das ebenfalls mit dem pp150-spezifischen Antiserum reagierte. Durch diese biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß ausgehend von dem Konstrukt pRC-150ST/S ein dem authentischen pp150 in Größe und Immunoreaktivität entsprechendes Protein exprimiert wurde. Das Konstrukt pRC-150ST/S wurde im folgenden dazu verwendet, die permissive Astrozytoma-Zelllinie U373MG zu transfizieren. Dazu wurden 10 x 10⁶ Zellen mit 10 µg ScaI-linearisierter DNA durch Elektroporation transfiziert und in eine Kulturschale ausgesät. 48 h nach Transfektion wurden sie fixiert und pp150 immunzytochemisch mit PAb XP1 nachgewiesen (Abbildung 3.3. b). Parallel dazu wurden mit pRC-150ST/AS transfizierte und infizierte Zellen untersucht (Abb. a und c). In infizierten Zellen (Abb. a) konnte pp150 im Zytoplasma und im Kern lokalisiert werden (Hensel et al., 1995). Im Zytoplasma lag es konzentriert in einer Kernnahen Region vor, die dem Viroplasma entspricht. Im Kern wurden fleckenartige Strukturen angefärbt. In den mit pRC-150ST/S transfizierten U373MG (Abb. b) konnte dagegen nur eine diffuse Färbung des Zytoplasmas mit einer Konzentration an der Kernhülle beobachtet werden. Die scheinbar intranukleäre Färbung wurde durch Einwölbung der Kernhülle hervorgerufen. Folglich sind für den Kern-Transport von pp150 noch weitere virale Faktoren notwendig.

- (a) Infektion HCMV
- (b) Transfektion UL32 sense
- (c) Transfektion UL32 antisense

Abbildung 3.3: Vergleich der pp150-Lokalisation in infizierten und transfizierten U373MG. Die Zellen wurden HCMV-infiziert und 3 d p.i. fixiert (HCMV) (a) bzw. durch Elektroporation mit dem pp150- Expressions-Konstrukt pRc-150ST/S transfiziert (UL32 sense) (b) und 2 d nach Transfektion fixiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem antisense-Konstrukt pRc-150ST/AS transfiziert (UL32 antisense) (c). Der Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte durch das anti-pp150-Antiserum PAb XP1 (1:250) und einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper. Vergrößerung: 960x (a u. b), 384x (c).

Die Transfektion mit pRC-150ST/AS erzeugte kein nachweisbares Antigen (Abb. c). Mehrmalige Versuche, stabile pp150-positive Zelllinien nach Transfektion mit pRC-150ST/S zu isolieren, scheiterten, was darauf hindeutet, daß die Expression von pp150 eine antiproliferative Wirkung auf die transfizierten Zellen ausübte.

3.2 Herstellung stabil UL32-antisense-mRNA exprimierender Zelllinien

Um die Expression von pp150 während einer HCMV-Infektion zu hemmen und damit Aufschlüsse über seine Funktion zu erlangen, sollten Zelllinien erzeugt werden, die stabil UL32 AS-mRNA exprimieren. Eine solche Zelllinie erlaubt eine konstante Expression des hemmenden Agens und erleichtert damit reproduzierbare Versuchsbedingungen in einer Serie von Experimenten. Gleichzeitig kann durch geeignete Wahl des Expressionssystems eine hohe Transkriptionsrate erreicht werden, die für die Inhibition eines stark exprimierten Gens der späten Phase wie UL32 notwendig ist. Als Zellsystem wurde die für eine HCMV-Infektion vollständig permissive humane Astrozytoma-Zelllinie U373MG gewählt. Als Kontrolle der AS- mRNA Wirkung sollten zusätzlich Zelllinien erzeugt werden, die dasselbe Genfragment in sense-Orientierung exprimieren, und solche die den Vektor ohne fremdes Genfragment in ihr Genom integriert haben.

3.2.1 Klonierung der UL32-antisense-mRNA Expressionsvektoren

Für den Erfolg des AS-mRNA Expressionssystems spielen sowohl der Vektor als auch die Wahl des zu exprimierenden UL32 Genfragment eine entscheidende Rolle. Als eukaryontischer Expressionsvektor diente pRC/CMV. Von diesem Vektor erfolgt eine in eukaryontischen Zellen konstitutive Expression des in den Polylinker eingefügten Genfragments unter der Kontrolle des Major Immediate Early Promoters/Enhancers (MIEP) des Zytomegalievirus (Abb. 3.4.). Dieser Promoter wird nach Infektion zusätzlich durch Genprodukte der sehr frühen und frühen Phase induziert, wodurch eine hohe Expression während des ganzen Infektionszyklus erwartet werden kann (Stamminger & Fleckenstein, 1990). Die entstehende mRNA wird durch das Polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormons (BGH pA) polyadenyliert und stabilisiert. Als Selektionsmarker enthält pRC/CMV das Neomycin- Resistenzgen unter der Kontrolle des SV40 early Promoters, wodurch stabile Transfektanten aufgrund ihrer Resistenz gegen das Neomycin-Analogon Geneticin (G418) isoliert werden konnten.

Abbildung 3.4: Schema der Klonierung der UL32-antisense-Expressionsvektoren. Dargestellt ist die Position des offenen Leserahmens von pp150 (ORF UL32) im Genom des HCMV und der in die 6,2 kb mRNA transkribierte Bereich. Weiterhin wird die Position und die Schnittstellen der beiden verwendeten UL32-Fragmente angezeigt. Die Klonierung erfolgte in antisense-Orientierung zum major immediate early promoter (CMV MIEP) des eukaryontischen Expressionsvektor pRC/CMV. Für die genauen Klonierungsschritte s. Abbildung 2.3.

Wie in der Einleitung erläutert, stehen aus der Literatur keine generellen Kriterien für die Wahl eines geeigneten Genfragments für die effektive Hemmung eines Ziel-Gens zur Verfügung. Es wurden daher parallel zwei AS-Expressionskonstrukte mit unterschiedlichen UL32 Genab- schnitten hergestellt. Als häufig erfolgreich haben sich Genfragmente erwiesen, die aus dem 5' - Bereich stammen, da sie Initiation der Translation einer Ziel-mRNA effektiv inhibieren können (Murray & Crockett, 1992). Daher wurde zunächst das UL32 2,1 kb SstII/ApaI Genfragment (bp -83 bis +1993) ausgewählt. Es repräsentiert den 5' -Bereich von UL32 und schließt einen Teil des 5' -nicht-translatierten Bereich, das Startcodon und etwa 60 % des ORF ein. Insgesamt deckt es etwa 30 % der viralen 6,2 kb UL32 mRNA ab (Abb. 3.4.). Für den Fall, daß dieses System nicht die erwartete Reduktion der pp150-Expression erreicht, wurde ein größerer Abschnitt aus dem mittleren

und 3'-Bereich ausgewählt. Dieses 3,5 kb EcoRI-Fragment (bp +337 - +3873) beinhaltet etwa 90 % von UL32 und weitere 0,6 kb aus dem langen 3'-nicht-translatierten Bereich, insgesamt etwa 60 % der UL32 sense-mRNA. Beide Genfragmente wurden parallel so in den Vektor pRC/CMV kloniert, daß sie relativ zum Promoter in antisense Orientierung standen (Abb. 3.4.). Für Kontrollexperimente wurden Konstrukte hergestellt, in denen die genannten DNA-Fragmente in sense-Orientierung standen. Die genauen Klonierungsschritte werden unter 2.7.2 erläutert.

3.2.2 Transfektion und Selektion von U373MG

Um Zellen in Kultur mit DNA-Vektoren zu transfizieren, stehen eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. Für U373MG ist jedoch die Elektroporation bereits gut etabliert (Ripalti et al., 1995). Sie erlaubt zudem eine Verdünnung der in Suspension befindlichen Zellen direkt nach Transfektion in kleine Einzelkulturen (96-multi-well plates). Je 20×10^6 Zellen wurden parallel mit je 20 µg linearisierter DNA der beiden AS- bzw. der Kontroll- Vektoren transfiziert und in je 300 bis 400 Einzelkulturen zu je 2×10^6 überlebender Zellen verdünnt. Nach 3 Tagen wurde dem Kulturmedium das Neomycin-Analogon Geneticin (G418) in einer Konzentration von 400 mg/ml zugefügt. Dieser Selektionsdruck wurde über 3 Wochen ausgeübt, an deren Ende nicht-resistente Zellen abgestorben waren. Es hatten sich in dieser Phase in höchstens 20% der Kulturen stabile Kolonien gebildet, die daher mit hoher Wahrscheinlichkeit aus Einzelklonen hervorgegangen waren und homogene Kulturen bildeten. Sie wurden umgesetzt und weiter unter Selektionsdruck expandiert. Im folgenden werden diejenigen Zellklone, die mit dem 5'-2,1 kb SstII/ApaI Genfragment (UL32 bp -83 - +1993) transfiziert wurden, als U3/AA (antisense) bzw. U3/SA (sense) bezeichnet. Diejenigen mit dem 3,5 kb EcoRI-Fragment (UL32 bp +337 - +3873) transfizierten Zellen erhalten die Bezeichnung U3/AE (antisense) und U3/SE (sense), gefolgt von einer Nummer für den entsprechenden Zellklon. Parallel zu den UL32-Konstrukten wurde auch der Vektor pRC/CMV unter den gleichen Bedingungen transfiziert und selektioniert. Resistente Zellklone, die den Vektor integriert hatten, wurden in den folgenden Experimenten als Kontrolle verwendet und mit U3/RC bezeichnet. Alle erzeugten Zelllinien wurden mehrmals dem Selektionsdruck unter G418 ausgesetzt und waren über 20 - 30 Passagen in ihrer Expression stabil.

Abbildung 3.5: Amplifikation eines UL32-Bereiches durch PCR zur Identifikation von Zellkolonien mit integriertem UL32-Expressions-Konstrukt. Das Schema (c) stellt die Position des durch die Primer HM1 und HM2 amplifizierten Bereiches im ORF UL32 und in den beiden transfizierten UL32- Fragmenten dar. Abb. (a) zeigt exemplarisch Amplifikationen mit Lysaten der Zellklone U3/AA2, U3/SA1, U3/AE2. Als Kontrolle diente Lysat nicht-transfizierter U373MG (control) und H2O (none). (b) Southern-Blot-Analyse der PCR-Produkte zum Nachweis der Amplifikations-Spezifität mit dem Oligonukleotid HM3 als Sonde. U3/AA2 und U3/AE2 erwiesen sich als positiv, U3/SA1 als negativ.

Da die beiden Merkmale eines transfizierten Konstruktes, der Selektivmarker und das zu exprimierende Insert, häufig nicht gemeinsam weitergegeben werden, mußte überprüft werden, ob auch die UL32 Genabschnitte in das Genom der resistenten Wirtszellen integriert wurden. Die Integration des UL32-Fragments wurde anhand spezifischer Amplifikation durch eine Polymerase Ketten Reaktion (PCR) in allen resistenten Klonen untersucht. Dafür wurden die Primer (HM1 und HM2) so ausgewählt, daß ein Genabschnitt (UL32 bp 1102-1403) aus der überlappenden Region des UL32 5'- und des 3'-Bereichs amplifiziert wurde und damit beide Konstrukte identifiziert werden konnten (Abbildung 3.5 c). Die Amplifikation erfolgte ausgehend von Gesamt-DNA aus Lysaten resistenter Zellkolonien. Die Amplifikationsprodukte wurden zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Ein exemplarisches Experiment, in dem zwei positive und ein negativer Zellklon identifiziert wurden, ist in Abbildung 3.5 a dargestellt. Nach Transfer auf Nylon-Membranen wurde die Spezifität der Amplifikation durch Hybridisierung mit einem markierten internen Oligonukleotid (HM3, UL32 bp 1325-1345) verifiziert (Abbildung 3.5 b). Die Ergebnisse der Selektion und des PCR-Screenings sind in Tabelle 3.1. zusammengefaßt. Es wird deutlich, daß bei gleichen Bedingungen die Transfektion mit dem 3'-Konstrukt zu weniger resistenten und darüber hinaus zu einem geringeren Anteil von PCR-positiven Klonen führte als bei dem 5'-Konstrukt.

Kolonien/ Klone	U3/AA (5 Bereich)	U3/SA (5 Bereich)	U3/AE (3 Bereich)	U3/SE (3 Bereich)

Abbildung 3.4: Schema der Klonierung der UL32-antisense-Expressionsvektoren. Dargestellt ist die Position

				Bereich)
G418-resistente	71	66	50	11
PCR-positive	70	47	30	4
RNA-positive	11	8	0	0

Tabelle 3.1.: Zusammenfassung des Screenings der mit UL32 antisense mRNA Expressionsvektoren transfizierten U373MG. U373MG wurden mit den angezeigten Konstrukten transfiziert und mit verschiedenen Verfahren nacheinander selektioniert. G418-resistente bezeichnet die Zahl der überlebenden Klone nach dreiwöchiger Behandlung mit Geneticin. Bei PCR-positiven Klonen konnte das transfizierte UL32-DNA-Fragment detektiert werden. Von den RNA-positiven konnte durch Northern- Blot-Analyse die Transkription einer rekombinanten UL32-mRNA nachgewiesen werden. Näheres siehe Text.

3.2.3 Identifizierung von UL32-mRNA exprimierenden Zellklonen

Die Integration des transfizierten Konstrukts erfolgt durch zufällige Rekombination in das Wirtsgenom. Dadurch können notwendige Abschnitte für die Expression verloren gehen. Um zu klären, ob diejenigen Zellklone, in denen das jeweilige Konstrukt nachgewiesen wurde, auch tatsächlich UL32 mRNA exprimierten, wurde zelluläre RNA isoliert und eine reverse Transkription mit anschließender PCR nach obigen Muster durchgeführt. Dieser Ansatz erwies sich als zu anfällig für virale Kontaminationen, weshalb kein eindeutiger Nachweis von UL32 mRNA möglich war. Aus diesem Grunde sollte die rekombinante UL32 mRNA durch eine Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Diese Methode hat zudem den Vorteil, daß der Grad der Expression quantitativ abgeschätzt werden kann. 20 µg Gesamt-RNA der einzelnen Klone wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und mit dem UL32 SstII/ApaI (UL32 bp -83 bis 1993) als radioaktive Sonde hybridisiert. Diese erkennt das 5' sowie das 3'-Fragment (s. Abb. 3.4.). Als Positivkontrolle wurde Gesamt-RNA infizierter U373MG aufgetragen. Ein exemplarischer Blot ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Durch dieses Screening konnten eine Reihe von U3/AA- und U3/SA-Klonen identifiziert werden, die eine 2 - 2,2 kb mRNA konstitutiv exprimierten, welche mit der UL32-Sonde reagierten. Diese mRNA entsprach in ihrer Länge dem erwarteten Transkript des 5'-UL32-Fragments. Dagegen wurden jedoch nach der Untersuchung aller PCR-positiven U3/AE- oder U3/SE-Klone keine Zelllinien identifiziert, die nachweisbare Mengen des Transkripts des 3'-UL32-Fragments mit einer erwarteten Größe von 3,5 kb exprimierten.

Abbildung 3.6: Exemplarische Northern-Blot-Analyse zur Identifikation von Zellklonen, die rekombinante UL32-mRNA exprimieren. 20 µg Gesamt-RNA aus transfizierten Zellklonen wurde im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem UL32 SstII/ApaI DNA-Fragment (s. Abb. 3.4.) als ³²P-markierte Sonde. Als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus mock- und HCMV-infizierten U373MG. Die Positionen der 28S- und 18S-RNA sind markiert. In diesem Fall wurde aufgrund geringer Transfereffizienz nur die virale UL32 3-kb-RNA dargestellt (HCMV).

Die Ergebnisse des gesamten Screenings sind in Tabelle 3.1. zusammengefaßt. Sie zeigen, daß die 3'-UL32-Konstrukte mit geringerer Effizienz integriert wurden und daß von den wenigen DNA-positiven Klone keine identifiziert werden konnten, die eine rekombinante UL32 mRNA exprimierten. Das könnte damit erklärt werden, daß diese Konstrukte nur schlecht abgelesen werden konnten oder daß die transkribierte längere mRNA instabil war. Alle weiteren Experimente wurden daher ausschließlich mit Zellen durchgeführt, die das UL32 5' SstII/ApaI Fragment (UL32 bp -83 - 1993) exprimieren und im folgenden auch kurz als sense- bzw. antisense (AS)-Zellen bezeichnet werden.

3.3 Standardisierung der HCMV-Infektion von U373MG

Mit der Herstellung von stabilen Zelllinien wurde ein Versuchssystem geschaffen, das reproduzierbare Bedingungen in Bezug auf Wirtszelle und AS-mRNA Produktion garantierte. Um im Verlauf der Experimente auch vergleichbare Infektionsbedingungen zu erreichen, sollte die Infektion soweit es möglich war standardisiert werden. Dazu wurde für alle Experimente derselbe Ansatz eines Virusstockes verwendet, dessen Infektiosität mit Hilfe der TCID₅₀-Messung (tissue culture infective dose 50) bestimmt wurde (s. 2.9.3). Danach infizierte 1 ml dieses Virusstocks in einer Verdünnung von 10^{-4,75} eine Kultur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50%, was einem Titer von 10^{4,75}/ml entspricht. Die virale Dosis wird im folgenden mit TCID₅₀/Zelle angegeben.

Abbildung 3.5: Amplifikation eines UL32-Bereiches durch PCR zur Identifikation von Zellkolonien, die UL32 integriert haben.

Abbildung 3.7: HCMV-Infektions-Effizienz der Zellklone U3/RC1 (Vektor-Kontrolle) und U3/AA35 (Antisense-Zelllinie). Die Zellen wurden mit verschiedenen Virusdosen infiziert (0,01 - 0,12 TCID₅₀/Zelle) und 1 d p.i. fixiert. HCMV-IE-Antigen-positive Zellkerne wurden durch indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit dem anti-CMV-early-protein-Antiserum identifiziert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hoechst-Farbstoff H33258. Dargestellt ist der Anteil der IE-positiven Zellkerne an den Hoechst-positiven bei U3/RC1 und U3/AA35.

Um die für U373MG relevanten viralen Dosen zu ermitteln, wurden U373MG mit ansteigenden Mengen des Virusstocks infiziert und anschließend der Anteil der HCMV- positiven Zellen bestimmt. Parallel dazu wurde auch die AS-Zelllinie U3/AA35 untersucht, um zu prüfen, ob die Infizierbarkeit durch die AS-mRNA herabgesetzt wurde. Dazu wurden die Zellen in verschiedenen Kulturen mit einer Konzentration von 106 Zellen/ 25 cm² ausgesät und am folgenden Tag parallel mit Dosen von 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 und 0,12 TCID₅₀- Einheiten pro Zelle in 500 µl Medium für 90 min infiziert. Ein Tag nach Infektion wurden infizierte Zellen durch immunzytochemischen Nachweis des HCMV IE-Antigens identifiziert und ihr Anteil an der Gesamtpopulation bestimmt. Die Ergebnisse (Abbildung 3.7) zeigen übereinstimmend mit Klöckl et al., in Vorbereitung, daß der Anteil der infizierten Zellen von 50 - 60 % auch bei höheren Dosen nicht überschritten wird. Im unteren Bereich steigt dieser Anteil proportional zur Virusdosis bis er bei einer TCID₅₀ von 0,04/Zelle annähernd den maximalen Wert erreicht. Wenn nicht anders angegeben, wurden daher für alle weiteren Experimente der oben beschriebene Infektionsablauf und eine TCID₅₀ von 0,04/Zelle angewendet. Ein signifikanter Unterschied in der Infizierbarkeit der Kontroll- und AS-Zellen konnte nicht festgestellt werden.

3.4 Untersuchung der viralen und der rekombinanten UL32 mRNAs in HCMV-infizierten Zelllinien

3.4.1 Untersuchung des Expressionsmuster der viralen und der rekombinanten UL32 mRNAs im Verlauf einer Infektion

Für die weiteren Untersuchungen wurden aus den positiven Klonen die folgenden ausgewählt: (i) die Vektor-Zelllinie U3/RC1, (ii) die stark exprimierende sense-Zelllinie U3/SA9 und (iii) zwei AS-Zelllinien U3/AA32 und U3/AA35, die eine schwache bzw. starke Expression der UL32 AS-mRNA aufwiesen. Um den zeitlichen Verlauf der Expression der viralen und der rekombinanten UL32 mRNAs während einer HCMV-Infektion zu untersuchen, wurden die genannten Zelllinien HCMV- bzw. mock-infiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurde die Gesamt-RNA isoliert, in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Filter transferiert. Dieser Northern-Blot wurde im folgenden mit verschiedenen 32P- markierten Sonden hybridisiert. Für den Nachweis der UL32-mRNA wurde erneut das UL32 SstII/ApaI DNA-Fragment (UL32 bp -83 bis 1993, s. Abb. 3.4.) verwendet, das sowohl sense- als auch AS-RNA detektiert. Die viralen UL32-mRNA wies in der Kontrollzelllinie U3/RC1 das typische Expressionsmuster der späten Phase auf (Abb. 3.8.), das zwischen 24 und 48 h p.i. beginnt und bis 72 h p.i. stark ansteigt. Als prominenteste Bande trat die 6,2 kb mRNA auf, daneben wurden noch zwei schwächere Banden auf der ungefähren Höhe von 8 kb bzw. 3 kb detektiert. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit den Ergebnissen aus Fibroblasten (Jahn et al., 1987). In den AS-Zelllinien konnte eine schwache Expression der rekombinanten 2,1 kb UL32 mRNA bereits in nicht-infizierten Zellen nachgewiesen werden, in U3/AA32 jedoch erst nach sehr langer Exposition. 24 h p.i. wurde Expression der rekombinanten mRNA in beiden AS-Zelllinien aufgrund der Aktivierung des MIEP hochreguliert und blieb während des ganzen Infektionszykluses auf hohem Niveau. Der gleiche Effekt konnte auch in U3/SA9 beobachtet werden, hier ist jedoch das Expressionsniveau der 2,1 kb sense- RNA bereits in nicht infizierten Zellen sehr hoch. Zur Kontrolle wurde derselbe Filter mit einer Sonde für G3PDH hybridisiert.

Abbildung 3.8: Expressionsmuster der viralen und rekombinanten UL32-mRNA im Verlauf einer HCMV-Infektion in den Klonen U3/RC1, U3/SA9, U3/AA32 und U3/AA35. Die Zellen wurden HCMV- infiziert, ihre Gesamt-RNA wurde zu den angezeigten Zeitpunkten (24 - 72 h p.i.) isoliert und in einer Northern-Blot-Analyse untersucht. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA nicht-infizierter Zellklone auf- getragen (Mo). Als 32P-markierte Sonde zur Identifikation der UL32-mRNAs diente das UL32 SstII/ApaI-DNA-Fragment (s.Abb. 3.4.). Die Position der viralen 6,2 kb mRNA und die der rekombinanten 2,1 kb mRNA (rekomb. = sense bzw. antisense) sind markiert. Derselbe Blot wurde mit einer UL55-Sonde zum Nachweis der 3,7 kb gB-mRNA hybridisiert. Die aufgetragenen RNA-Mengen wurden mit einer G3PDH-Sonde kontrolliert.

Bereits durch diese Northern-Blot-Analyse wurde deutlich, daß die virale 6,2 kb sense- mRNA in den AS-Zellen gegenüber der Kontrolle reduziert war. Um diese Beobachtung durch Quantifizierung zu bestätigen, wurde die Gesamt-RNA infizierter Zellklone in drei unabhängigen Experimenten isoliert und die UL32-mRNA nach Northern-Blot-Hybridisierung durch einen Phosphor-Imager analysiert. Dabei wurde das Signal für die 6,2 kb mRNA mit dem G3PDH-Signal jeder Spur abgeglichen und unter den verschiedenen Klonen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2. als prozentuale Reduktion gegenüber den Kontrollwerten (U3/RC1) dargestellt. Diese Quantifizierung zeigte, daß die Reduktion in beiden AS-Zelllinien signifikant war. Sie war jedoch in U3/AA32 geringer als in U3/AA35 (73% bzw. 85%), entsprechend des geringeren Expressionsniveaus von AS-mRNA in diesen Zellen. Die Gleichgewichtsmenge der AS-mRNA war in U3/AA35 72 h p.i. etwa 3-4mal größer als in U3/AA32. Um die Selektivität des inhibitorischen Effekts der AS-mRNA auf UL32 zu überprüfen, sollte die Expression eines anderen späten Gens untersucht werden. Dazu wurde derselbe Filter mit einer Sonde hybridisiert, die spezifisch für UL55, dem ORF des späten Glykoproteins gB, ist. Abbildung 3.8. zeigt die Detektion des 3,7 kb-Haupttranskripts von UL55. Die Quantifizierung erfolgte unter den selben Bedingungen wie für UL32, und zeigte, daß auch die UL55 mRNA Menge in U3/AA32 und U3/AA35 reduziert war. Diese Reduktion (17% bzw. 37%) erreichte jedoch nicht das gleiche Ausmaß wie bei der UL32 mRNA.

	mRNA	mRNA	Protein	Protein	Protein	Protein
	72 h pi	72 h pi	72 h pi	72 h pi	72 h pi	24 h pi
	UL32	UL55	pp150 (ppUL32)	gB (gpUL55)	pp65 (ppUL83)	pp52 (ppUL44)
U3/AA32	73% (±14)	17% (±5)	79% (±12)	67% (±14)	0% (±15)	1% (±7)
U3/AA35	85% (±2)	37% (±5)	90% (±5)	80% (±8)	23% (±6)	3% (±11)

Tabelle 3.2.: Reduktion viraler mRNA-Gleichgewichtsmengen und viraler Protein-Syntheseraten in UL32 antisense exprimierenden U373MG-Zellen. Die Werte geben den Prozentsatz der Reduktion gegenüber dem Kontrollwert aus der Zelllinie U3/RC1 wieder.

Durch Quantifizierung der UL32 mRNA in der als Kontrolle mit untersuchten sense-Zelllinie U3/SA9 wurde festgestellt, daß die Reduktion in diesen Zellen 72% (Standardabweichung: 4%) betrug. Der inhibitorische Effekt auf die UL32 mRNA in U3/SA9 lag damit in der gleichen Größenordnung wie in den AS-Zellen.

3.4.2 Untersuchung der UL32 mRNA Expression mit strangspezifischen Sonden.

Bisher wurde die rekombinanten UL32 mRNAs aus den transfizierten Zellen nur mit Doppelstrang-DNA Sonden in der Northern-Blot-Analyse untersucht, mit denen nicht die Orientierung der jeweiligen Transkripte differenziert werden konnte. Da es aber denkbar ist, daß das transfizierte UL32-Fragment nach Integration in das Wirtszellgenom unter dem Einfluß eines zellulären Promoters in unerwarteter Richtung exprimiert wurde, sollten die unterschiedlich orientierten UL32 mRNAs mittels strangspezifischen RNA-Sonden identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA von mock- und HCMV-infizierten sense- und AS-Zellen isoliert und zunächst wieder mit der UL32 spezifischen DNA-Sonde im Northern-Blot analysiert (Abb. 3.9. a).

Abbildung 3.9: Northern-Blot-Analyse der UL32-mRNAs in sense- und antisense-Zellen mit strang-spezifischen RNA-Sonden. Die Gesamt-RNA aus nicht-infizierten (-) und HCMV-infizierten (+) Zellen wurde 72 h p.i. isoliert und nach Auftrennung im Agarose-Gel und Transfer auf Nylonmembran zunächst mit einer 32P-markierten UL32-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert (a). Derselbe Filter wurden anschließend mit in-vitro-transkribierter 32P-markierter UL32-antisense- (b) und sense-RNA (c) als UL32-spezifischer Sonde hybridisiert. Die Höhe der viralen UL32 6,2 kb mRNA (gefüllter Pfeil) und die der rekombinanten mRNA (leerer Pfeil) sind markiert.

In allen Zelllinien einschließlich der Vektor-Kontrolle U3/RC1 konnte die virale 6,2 kb UL32 mRNA detektiert werden. In den sense- und AS-Zellen wurde außerdem die rekombinante 2,1 kb UL32 mRNA nachgewiesen. Für die Analyse ihrer Orientierung wurden radioaktive RNA-Sonden mittels in-vitro-Transkription des Konstruktes pBUL32/S1-A5 hergestellt. Dieses Konstrukt wurde aus dem

Abbildung 3.8: Expressionsmuster der viralen und rekombinanten UL32-mRNA im Verlauf einer HCMV-Infektion.

pBluescript KS+ Vektor durch Insertion des UL32 385 bp SmaI-Fragments (UL32 bp 1563 - 1948) in sense-Orientierung relativ zum b-Galaktosidase- Gen hergestellt. Die in-vitro-Transkription, ausgehend vom T7-Promoter, erzeugte daher eine antisense-RNA, ausgehend vom T3-Promoter dagegen eine sense-RNA (Näheres s. 2.12.3.2). Derselbe Northern-Blot wurde daraufhin nacheinander mit den beiden RNA- Sonden hybridisiert und einem Röntgenfilm exponiert. Abbildung 3.9. b zeigt, daß die antisense-RNA-Sonde, die für UL32 sense-Transkripte spezifisch ist, die virale 6,2 kb mRNA in infizierten U373MG erkannte. Außerdem wurde die rekombinante 2,1 kb mRNA in U3/SA9 detektiert, nicht aber diejenige in U3/AA32 oder U3/AA35, wodurch die erwartete sense-Transkription in U3/SA9 gezeigt werden konnte. Umgekehrt erkannte in Abbildung 3.9. c die für AS-Transkripte spezifische sense-Sonde die rekombinante 2,1 kb mRNA nur in U3/AA35 und mit einem schwachen Signal auch in U3/AA32, das erst nach längerer Exposition deutlich wurde. Sie reagierte erwartungsgemäß weder mit der viralen sense-mRNA in infizierten Zellen noch mit der rekombinanten in U3/SA9. Folglich wurde die rekombinante UL32 mRNA auch in AS-Zellen in korrekter antisense-Orientierung exprimiert.

3.4.3 Gegenseitige Abhängigkeit der Gleichgewichtsmenge von viraler und anti-sense-UL32-mRNA

Um zu klären, ob auch in den UL32 AS-mRNA Zellen die Reduktion der sense-mRNA Gleichgewichtsmenge (steady state level) tatsächlich durch direkte Wechselwirkung mit der AS-mRNA erfolgte und nicht durch einen indirekten Effekt, wurden U3/RC1 und U3/AA35 parallel mit ansteigender viraler Dosis (TCID₅₀/Zelle von 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 und 0.08) infiziert. Dadurch wurde erreicht, daß in den verschiedenen Ansätzen die Expression der 6,2 kb sense-mRNA kontinuierlich erhöht wurde. Auf der anderen Seite konnte die Transkription der 2,1 kb AS-mRNA in U3/AA35 nach maximaler Induktion nicht gesteigert werden, da die Zahl der vorhandene Kopien des transfizierten Konstruktes konstant blieb. Auf diese Weise wurde mit steigender zellulärer Virusdosis das Verhältnis von sense- zu AS-mRNA erhöht, wodurch Hinweise auf den wechselseitige Einfluß der Transkription auf den steady-state level der jeweils anderen mRNA aufgedeckt werden konnten. Aus den auf diese Weise infizierten Zellen wurde die Gesamt-RNA 72 h p.i. isoliert und wie oben durch Northern-Blot-Analyse mit der DNA-Sonde untersucht (Abb. 3.10.). Wie erwartet erhöhte sich in der Kontrolle U3/RC1 die Menge der sense-mRNA mit steigender Virusdosis. In U3/AA35 stieg die Menge der sense-mRNA ebenfalls an, jedoch auf einem stark reduzierten Niveau, so daß sie erst bei höchsten Virusdosen detektiert werden konnten. Die AS-mRNA dagegen konnte bei geringer Dosis in großer Menge nachgewiesen werden. Sie stieg zunächst bis zu einer Virusdosis von 0,02 TCID₅₀/Zelle an, sank aber bei weiter steigender Dosis bis auf ein nicht detektierbares Niveau ab. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß die AS-mRNA bei geringer viraler Gendosis im Überschuß vorlag und die relativ geringe Menge von sense-mRNA vollständig degradiert wurde. Bei hoher Virusdosis war das Verhältnis umgekehrt, so daß unter diesen Bedingungen die AS- mRNA aufgebraucht wurde und der Überschuß der sense-mRNA in der Zelle verblieb. Die gegenseitige Abhängigkeit der beiden mRNA Spezies läßt auf eine direkte Wechselwirkung in Form einer stöchiometrischen Hybridisierung und nachfolgender Degradation schließen, wie sie als Wirkmechanismus von AS-mRNA vorgeschlagen wird (Nellen & Lichtenstein, 1993).

Abbildung 3.10: Northern-Blot-Analyse der viralen und rekombinanten UL32-mRNAs in Abhängigkeit von der HCMV-Infektionsdosis in U3/RC1 und U3/AA35. Die Zellen wurden mit steigender Dosis infiziert (0.01 - 0.08 TCID₅₀/Zelle) und 72 h p.i. ihre Gesamt-RNA mit einer ³²P-markierten UL32- spezifischen DNA-Sonde untersucht. Die Höhe der viralen UL32 6,2 kb mRNA (gefüllter Pfeil) und die der antisense-mRNA (leerer Pfeil) sind ebenso wie die der 28S- und 18S-RNA markiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA-Menge wurde derselbe Filter mit einer G3PDH-Sonde hybridisiert. Mo, RNA nicht-infizierter Zellen

Weiterhin konnte aus diesen Ergebnissen ermittelt werden, daß es eine optimale Infektionsdosis um 0,04 TCID₅₀/Zelle gab, die einen signifikanten Effekt der AS-mRNA erreichte und gleichzeitig für die Untersuchungen eine ausreichende Infektion erlaubte.

3.5 Untersuchung der viralen Proteinbiosynthese durch Immunpräzipitation

3.5.1 Einfluß der rekombinanten UL32 mRNA auf die Biosynthese von pp150

Das Ausmaß der Hemmung eines Gens durch AS-mRNA wird nicht allein durch die Reduktion des steady-state levels seiner mRNA bestimmt, da auch die stabile Duplex- Bildung, die nicht in der durchgeführten Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden kann, zur Inhibition der Translation führt (Kim and Wold, 1985). Um den Grad der Reduktion der pp150-Protein-Biosynthese in AS-Zellen zu untersuchen, wurden Immunpräzipitations- experimente durchgeführt. Damit gleiche Bedingungen für alle Ansätze garantiert werden konnten, wurde parallel jeweils die gleiche Anzahl von Zellen der Linien U3/RC1, U3/SA9, U3/AA32 und U3/AA35 ausgesät und am folgenden Tag mit der gleichen viralen Dosis von 0,04 TCID₅₀/Zelle infiziert. 48 h bzw. 72 h nach Infektion wurden sie für 3 h metabolisch mit ³⁵S-Methionin/Cystein markiert und anschließend für 1 h mit nicht-radioaktiven Aminosäuren inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden Lysat-Mengen gleicher Radioaktivität für die Immunpräzipitation mit dem polyklonalen anti-pp150 Antikörper PAb XP1 eingesetzt. Die Präzipitate wurden anschließend im SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch visualisiert (Abbildung 3.11). In der Kontroll-Zelllinie U3/RC1 konnte neusynthetisiertes pp150 bereits 48 h p.i. präzipitiert werden, dessen Syntheserate bis 72 h p.i. stark anstieg. In den beiden AS-Zelllinien U3/AA32 und U3/AA35 konnte wie erwartet eine signifikante Reduktion der pp150-Synthese im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie U3/RC1 festgestellt werden. Die Zelllinie U3/SA9 zeigte eine Reduktion der Syntheserate im gleichen Ausmaß wie die AS-Zellen. Aufgrund dieses als Kosuppression bezeichneten inhibitorischen Effekts des sense-Transkripts (Jorgensen, 1990), der auch schon auf mRNA Ebene beobachtet wurde, konnte die Zelllinie U3/SA9 nicht als Kontrolle für weiterführende Experimente dienen.

Abbildung 3.11: Immunpräzipitation von pp150 aus Kontroll-, sense- und antisense-Zellen. Die Zelllinien U3/RC1, U3/SA9, U3/AA32 und U3/AA35 wurden 48 h bzw. 72 h nach HCMV-Infektion für 3 h radioaktiv markiert und lysiert. Lysat-Mengen gleicher Radioaktivität wurden für die Immunpräzipitation mit dem anti-pp150-Antiserum PAb XP1 eingesetzt. Die Abbildung zeigt einen mit den Präzipitaten exponierten Röntgenfilm nach Auftrennung im reduzierenden SDS-PAGE und Fluorographie. Die pp150-Bande ist markiert (gefüllter Pfeil). Der leere Pfeil weist auf die Bande des kopräzipitierten pp65.

3.5.2 Vergleichende Quantifizierung der pp150-Synthese mit der viralen Referenz- Proteine

Zur Untersuchung der Selektivität des inhibitorischen Effekts der AS-mRNA auf die Protein- Biosynthese, wurden parallel zu pp150 (ppUL32) auch andere virale Produkte präzipitiert, quantifiziert und ihre Syntheserate verglichen. Als Referenz dienten das Membranglykoprotein gB (gpUL55) und das Tegumentprotein pp65 (ppUL83) als Vertreter der späten Proteine und p52 (ppUL44) als Vertreter der frühen Proteine. Für die Präzipitation von gB und p52 wurden die monoklonalen Antikörper 27-156 bzw. BS510 und für die pp65-Präzipitation wurde das polyklonale Antiserum BGE1 verwendet. Die Zelllinien U3/RC1, U3/AA32 und U3/AA35 wurden wie oben beschrieben infiziert, radioaktiv markiert und 24 h bzw. 72 h p.i. geerntet. Die so gewonnenen Zellen jeder Kulturschale wurden geteilt und für die Präzipitation der jeweiligen Antigene unterschiedlich lysiert (s. 2.13.3.2). Die Lysatmengen wurden für die Fällung auf gleiche präzipitierbare Radioaktivität abgeglichen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Immunpräzipitate ist zur Veranschaulichung in Abbildung 3.12. dargestellt.

Abbildung 3.12: Repräsentative Immunpräzipitation viraler Proteine aus Kontroll- und antisense-Zellen.

Die verschiedenen Zelllinien wurden 72 h nach HCMV-Infektion für 3 h radioaktiv markiert. Die geernteten Zellen einer Kultur wurden geteilt und je nach präzipitiertem Antigen unterschiedlich lysiert (s. 2.13.3.2). Lysat-Mengen gleicher Radioaktivität wurden jeweils für die Immunpräzipitation von pp150, gB und pp65 eingesetzt. p52 wurde aus Zell-Lysaten 24 h p.i. präzipitiert. Die Präzipitate wurden im reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und nach Fluorographie exponiert. Bei gB wurde nur die Bande des 130 kDa-Vorläuferproteins gezeigt. mock inf, Lysat nicht-infizierter U373MG. Da die Spaltung des 130 kDa gB-Vorläufers in keiner der untersuchten Zelllinien beeinträchtigt war (Daten nicht gezeigt), wurde auf die Darstellung der Spaltprodukte verzichtet. Für die Quantifizierung wurden die Präzipitationen in drei voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt und die Radioaktivität der einzelnen Proteinbanden mit einem Phosphor-Imager gemessen. In Tabelle 3.2. wurden die Quantifizierungs-Ergebnisse als Prozentsatz des Kontrollwertes in U3/RC1 zusammengestellt. Aus den Daten wird deutlich, daß die pp150- Synthese in

den beiden AS-Zelllinien U3/AA32 und U3/AA35 signifikant reduziert wurde (79% bzw. 90%). Das Ausmaß der Reduktion entspricht damit dem Grad der Suppression der UL32 mRNA (73% bzw. 85%). Die geringere Synthese-Hemmung in U3/AA32 gegenüber der in U3/AA35 wies darauf hin, daß auch auf der Ebene der Translation die Reduktion abhängig von der Menge der AS-mRNA war. Durch die Präzipitation des Glykoproteins gB (gpUL55) wurde deutlich, daß die Inhibition der UL55-Translation mit 60% bzw. 70% weit größer war als die Reduktion der UL55-mRNA (17% bzw. 37%). Die Reduktion der mRNA-Menge korrelierte somit bei UL55 nicht mit der Hemmung der Protein-Synthese wie bei UL32. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß im Fall von gB noch ein zusätzlicher Mechanismus auf der Ebene der Translation wirkte. Die nur sehr geringe Hemmung der pp65 Biosynthese von 0% bzw. 20 % zeigte dagegen, daß in den AS-Zellen keinesfalls eine generelle Hemmung der späten viralen Proteinexpression vorlag. Die Untersuchung der p52-Biosynthese in der frühen Phase konnte aufdecken, daß dessen Expression unbeeinflusst blieb. Demnach zeigte die Expression der UL32 AS-mRNA, gemessen an der p52-Synthese, keinen Einfluß auf die frühe Phase der Virusreplikation.

3.5.3 Die Hemmung der pp150-Synthese ist abhängig von der UL32-antisense- mRNA Expression

Die Zelllinie U373MG besteht aus einer Population von Zellen, die sich in bezug auf die HCMV-Replikation heterogen verhalten. Nicht alle Zellen treten bis 3 Tage p.i. in die späte Phase der viralen Genexpression ein (Klößkl et al., in Vorbereitung). Daher mußte ausgeschlossen werden, daß die untersuchten Zelllinien aus Klonen entstanden waren, die unabhängig von der AS-mRNA nur eingeschränkt virale Gene exprimierten. Dazu wurden 4 Vektor-Zelllinien und 4 AS-Zelllinien, die nicht identisch mit den schon untersuchten waren, auf ihre Expression von pp150 untersucht. Unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben wurde pp150 aus den infizierten Zelllysaten immunpräzipitiert und quantifiziert. Die durchschnittliche Reduktion der pp150-Syntheserate in den AS-Zelllinien betrug 57% (Standardabweichung: 17%) gegenüber dem Mittelwert in den Kontrollzellen (Standardabweichung: 24%). Durch diese Messung konnte gezeigt werden, daß der beobachtete Effekt in U3/AA32 und U3/AA35 nicht durch endogene Heterogenität von Einzelklonen, sondern durch die Transfektion des AS-mRNA Expressionskonstrukts bedingt war.

3.6 Die Replikation der viralen DNA wird nicht gehemmt

Die bisherigen Daten zeigten, daß nicht nur die Proteinbiosynthese von pp150, sondern auch die von anderen späten Proteinen durch UL32-AS-mRNA beeinflusst wurde, daß aber die Expression des untersuchten frühen Proteins von diesem Effekt unbeeinflusst blieb. Da die Expression der UL32-AS-mRNA bereits 24 h p.i. stark hochreguliert wurde, sollte durch ein weiteres Experiment untersucht werden, ob Ereignisse der frühen Phase beeinträchtigt wurden. Aus diesem Grund wurde die Replikation der viralen DNA gemessen, da sie von einer Vielzahl früher viraler Gene abhängig ist.

Abbildung 3.13: Dot-Blot-Analyse der viralen DNA-Replikation in infizierten Kontroll- und antisense- Zellen. Gesamt-DNA wurde aus HCMV-infizierten Zellen 72 h p.i. isoliert und in einer fünffachen Verdünnungsreihe auf Nylonmembran immobilisiert. Als Kontrolle wurde Gesamt-DNA aus U373MG 12 h p.i. eingesetzt. Nach Hybridisierung mit einer 32P-markierten HCMV-spezifischen DNA-Sonde (UL5-9) wurde der Filter einem Röntgenfilm exponiert. Die rechts aufgeführten Werte geben die Menge der aufgetragenen Gesamt- DNA aus infizierten Zellen an.

Die Gesamt-DNA von Kontroll- und AS-Zellen wurde 72 h p.i. isoliert und in ansteigenden Verdünnungen auf einem Dot Blot immobilisiert. Als Kontrolle für inokuliertes Virusgenom diente eine Probe zellulärer DNA, die aus U373MG 12 h p.i. isoliert wurde. Der Filter wurde mit einer 32P-markierten HCMV-spezifischen DNA-Sonde (UL5-9, AD169 Genom bp 15147 - 17243 n. Bankier et al., 1991b) hybridisiert und einem Röntgenfilm exponiert. Wie Abbildung 3.13. zeigt, wiesen alle untersuchten Zelllinien vergleichbare Mengen an viraler DNA auf. Folglich kann man schließen, daß die virale DNA-Replikation und die Expression der dafür notwendigen frühen Genprodukte durch die Transkription der UL32 AS-mRNA nicht beeinträchtigt wurde.

3.7 Der inhibitorische Effekt in UL32-antisense-Zellen wurde nicht durch lösliche antivirale Faktoren hervorgerufen

Doppelsträngige RNA, die durch die Hybridisierung von sense- und AS-mRNA in infizierten AS-Zellen gebildet werden, kann ein zelluläres antivirales Abwehrprogramm induzieren (Lampson et al., 1967). Dieses Programm ruft die Sekretion von antiviralen Faktoren aus der Klasse der Interferone (IFN) hervor, die in den Zielzellen unter anderem eine Hemmung der Proteinbiosynthese auslösen. Es ist bereits bekannt, daß die Replikation des Zytomegalievirus durch Interferon insbesondere in Synergie mit dem Tumornekrosefaktor (TNF) gehemmt wird (Lucin et al., 1994). In den im folgenden beschriebenen Experimenten sollte geklärt werden, ob die in der späten Infektionsphase in AS-Zellen beobachtete Reduktion der Proteinsynthese auf die unspezifische Wirkung von löslichen antiviralen Faktoren zurückzuführen war.

3.7.1 Messung der Sekretion antiviraler Faktoren im heterologen System

Die antivirale Aktivität der Kulturüberstände von U373MG, U3/RC1, U3/AA32 und U3/AA35 wurde 48 h nach mock-Infektion und 24, 48 und 72 h nach HCMV-Infektion gemessen. Für die Messung wurde ein standardisierter Bio-Assay verwendet (Mosmann, 1983). Bei ihm diente der durch Vorinkubation mit den zu messenden Überständen auf HeLa-Zellen übertragende Schutz vor dem interferonsensitiven RNA-Virus Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV) als Meßgröße. Die Überlebensrate einer vorinkubierten Kultur und damit die Übertragung des antiviralen Schutzes wurde durch einen Lebendfarbstoff und kolorimetrischer Auswertung im ELISA bestimmt (näheres s. unter 2.10.1). Die Meßskala liegt dabei zwischen 0 % für ungeschützte und durch das Virus lysierte Zellen und 100 % für nicht infizierte und damit intakte Zellen. Diese so ermittelten Werten können mit denen einer IFN Standard-Reihe verglichen werden.

Abbildung 3.14: Untersuchung von Überständen der erzeugten Zelllinien auf einen antiviralen Effekt. (a) Messung des durch Zell-Überstände übertragenden Schutzes vor VSV-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit den Überständen mock- und HCMV-infizierter Zellklone vorinkubiert (Abszisse). Anschließend wurde der dadurch vermittelte Schutz vor einer VSV-Infektion bestimmt (Ordinate). **(b) Messung der Wirkung einer Vorinkubation von U373MG mit Kulturüberständen der Zelllinien auf die Virusfreisetzung.** Die Vorinkubationsmedien (Abszisse) wurden 48 h nach mock- bzw. HCMV-Infektion der Zelllinien gewonnen. Die Titer der vorinkubierten U373MG (Ordinate) wurden 96 h p.i. gemessen. Näheres s. unter 3.7. mock, Überstände nicht-infizierter Zellen.

Die Ergebnisse der Messungen sind im Diagramm der Abbildung 3.14. a dargestellt. Sie zeigen, daß bereits die Kulturüberstände von den beiden nicht infizierten Kontroll-Zelllinien einen Schutz von 40-55 % vermittelten, die der AS-Zelllinien sogar von 60-75%. Nach Infektion stieg dieser Wert bei den Kontroll-Zellen an, so daß die Überstände aller Zelllinien 48 h p.i. einen Schutz von etwa 70-80% übertrugen. Die durch diese Methode meßbare Aktivität antiviraler Faktoren lag in allen Zelllinien weit über der von nicht-konditioniertem Kulturmedium (DMEM + 2% FKS). Da die Werte der Kontroll- und AS-Zellen sich jedoch nur unwesentlich unterschieden, ist die hier gemessene Sekretion für die Beurteilung des AS- mRNA Effektes nicht von Bedeutung.

3.7.2 Wirkung der Kulturüberstände auf die HCMV-Replikation in U373MG

Bei dem verwendeten Bio-Assay handelt es sich um eine funktionelle Meßmethode, bei dem nicht die absolute Menge eines Faktors, sondern der Grad des Effektes auf ein spezifisches System untersucht wird. Um zu untersuchen, ob die erhöhten Werte auch eine Relevanz für das homologe System, d.h. die HCMV-Infektion von U373MG hat, wurden Überstände der Kontroll- und AS-Zelllinien 48 h nach mock- bzw. HCMV-Infektion gewonnen (Vorkulturen) und damit U373MG ü. N. vorinkubiert. Die mit den Medien der Vorkulturen vorinkubierten U373MG wurden anschließend HCMV-infiziert und der Effekt der Vorinkubation auf die HCMV-Replikation mit der Messung der Virustiter dieser Zellen 96 h p.i. bestimmt. Aus dem Diagramm in Abbildung 3.14. b wird deutlich, daß keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten zwischen der Höhe der Virustiter der Zellen, die mit den Überständen der Kontrollzellen (U373MG und U3/RC1) oder denen der AS-Zellen (U3/AA32 und U3/AA35) vorinkubiert wurden. Auch die Infektion der Vorkulturen hatte keine Einfluß auf diese Werte. Dadurch konnte gezeigt werden, daß das Medium der AS-Zellen keinen erhöhten Schutz vor HCMV-Infektion auf U373MG übertragen kann und die

Beteiligung von antiviralen Faktoren demnach vernachlässigt werden kann.

3.8 Untersuchung der Freisetzung infektiöser Virionen in UL32-antisense-mRNA exprimierenden Zellen

Nachdem festgestellt wurde, daß die Expression von pp150 durch die Anwesenheit der UL32 AS-mRNA signifikant gehemmt wurde, sollte geprüft werden, ob diese Reduktion einen Einfluß auf die Freisetzung von infektiösen Viren hatte. Um auch bei dieser Untersuchung den Einfluß des sense/antisense-mRNA Verhältnisses zu berücksichtigen, wurden die Zelllinien U373MG, U3/RC1, U3/AA32 und U3/AA35 mit jeweils zwei unterschiedlich hohen viralen Dosen (0.04 bzw. 0.08 TCID₅₀) infiziert. Die Virustiter der Kulturüberstände wurden 3 Tage nach Infektion durch Endpunktverdünnung bestimmt, anschließend wurde das Medium gewechselt und die Messung nach insgesamt 6 Tagen für dieselben Kulturen wiederholt. In Abbildung 3.15 sind die gesammelten Daten grafisch auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Bei Infektion mit niedriger Dosis konnten 3 Tage p.i. nur geringe Titer von allen Zelllinien gemessen werden. Beide AS-Zelllinien zeigten unter diesen Bedingungen einen gegenüber den Kontrollen um eine Größenordnung gesenkten Titer, die damit auf Höhe der Nachweisgrenze gesunken waren. 6 Tage p.i. konnten in den Kontrollen ein Titer von inzwischen $5-6 \times 10^6$ /ml gemessen werden. Beide AS-Zelllinien dagegen wiesen hier eine signifikante Senkung der Titer um 2-3 Größenordnungen auf. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Infektion mit hoher Dosis 3 Tage p.i. mit insgesamt etwas höheren Werten, aber dem gleichen signifikanten Grad der Reduktion in AS-Zelllinien. Nach 6 Tagen stiegen auch bei dieser Infektion alle Titer stark an, wobei der Unterschied von Kontroll- und AS-Zellen geringer wurde und auf nunmehr 1-2 Größenordnungen sank.

Abbildung 3.15: HCMV-Titer-Messung der Überstände von Kontroll- und antisense-Zellen. Die Zellen wurden jeweils mit einer niedrigen bzw. hohen viralen Dosis infiziert (0.04 bzw. 0.08 TCID₅₀/Zelle). Die Titer der Überstände wurden 3 und 6 d p.i. bestimmt. Die Ergebnisse wurden logarithmisch aufgetragen.

Mit den Messungen der Titer konnte gezeigt werden, daß die Expression von UL32-AS- mRNA mit für die Produktion von infektiösem Virus essentiellen Vorgängen interferiert. Auch bei der Virusfreisetzung hing der Grad des Effektes von der Stärke der Infektion und damit vom sense/antisense-mRNA-Verhältnis ab.

3.9 Ultrastrukturelle Untersuchung der HCMV-Infektion in Kontroll- und antisense-mRNA Zellen

Die Untersuchungen der viralen Proteinexpression hatten gezeigt, daß die Synthese von pp150 in den UL32 AS-mRNA exprimierenden Zellen stark reduziert wurde, auf der anderen Seite aber andere frühe und z.T. späte Ereignisse unbeeinflusst blieben. Das bedeutet, daß der virale Replikationszyklus bis in die späte Phase fortschreitet und strukturelle Proteine zu morphologischen Einheiten zusammengesetzt werden könnten. Die Messung der Virustiter zeigten dagegen, daß dabei nur sehr wenig infektiöse Partikel freigesetzt wurden. Für den elektronenmikroskopischen Ansatz wurden U373MG, U3/RC1, U3/AA32 und U3/AA35 mit einer mittleren viralen Dosis von 0.04 TCID₅₀/Zelle infiziert und 3 Tage nach Infektion präpariert. Bei der Wahl der Infektionsbedingungen wurden zum einen die vorangegangenen Experimente berücksichtigt, die gezeigt hatten, daß bei steigender Infektionsdosis die Wirkung der AS-mRNA abnimmt, zum anderen sollte eine ausreichend hohe Multiplizität gewählt werden, damit die Merkmale der Infektion und mögliche Unterschiede zwischen den Zelllinien hinreichend ausgeprägt waren. Die Zellen wurden vor der Fixierung für 1 h mit hochreiner Meerrettich-Peroxidase (HRP) inkubiert, die als Marker für die flüssige Phase des endosomalen Kompartiments fungiert. Nach Fixierung und Entwicklung mit Diaminobenzidin (DAB) konnte so das an der zytoplasmatische Umhüllung beteiligte tubuläre Endosom dargestellt und damit die späten Reifungsprozesse hervorgehoben werden. Um die zelluläre Morphologie möglichst gut zu erhalten, wurde der infizierte Zellrasen in der Kulturschale fixiert, flach eingebettet und in dieser Ebene geschnitten. Die Auswertung des Experiments erfolgte in einem Doppelblindversuch, in dem dem mikroskopischen Untersucher nicht bekannt war, mit welchem Konstrukt die zu untersuchende Zelllinie transfiziert worden war. Die im folgenden gezeigten Abbildungen stellen repräsentative Aufnahmen jeder Zelllinie dar.

3.9.1 Der zytopathische Effekt in UL32-antisense-mRNA Zellen ist nicht vermindert

HCMV-infizierte Zellen zeichnen sich durch einen ausgeprägten zytopathischen Effekt (CPE) aus, der vor allem bei infizierten Fibroblasten in Kultur deutlich wird. Die Zellen runden sich im Verlauf des ersten Tages nach Infektion zunächst ab, um dann während der nächsten Tage wieder abzuflachen und eine starke Vergrößerung des Zellvolumens einschließlich des Zellkerns auszubilden. Schon lichtmikroskopisch wird eine ausgeweitete Region mit granulären Strukturen im Zytoplasma deutlich. U373MG zeigen den gleichen, aber abgeschwächten Effekt, bei dem zusätzlich die Kerne segmentieren können.

Abbildung 3.16: Repräsentative elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen HCMV-infizierter U3/RC1 (a) und U3/AA35 (b). Die Zellen wurden 72 h p.i. fixiert und flach eingebettet. Das endosomale Kompartiment wurde vorher mit HRP markiert. Die zytoplasmatische Reifungsregion (Viroplasma, Pfeile), nukleäre dense bodies (DB, Pfeilspitzen) und der skein (Stern) sind markiert. Die Balken repräsentieren 2 µm; N, Kern;

Die elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahmen von U3/RC1 (a) und U3/AA35 (b) in Abbildung 3.16 zeigen repräsentativ, daß der CPE in keiner der untersuchten Zelllinien vermindert war. Die infizierten Zelllinien wiesen ein vergrößertes Zell- und Kernvolumen auf, eine Veränderung, die mit lichtmikroskopischen Beobachtungen bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Kerne (N) aller Zelllinien wiesen die für die HCMV-Infektion typische als skein (Stern) bezeichnete retikuläre Struktur und nukleäre dense bodies (DB, Pfeilspitze) (Severi et al., 1992) auf. Eingebettet in diese Strukturen konnten zahlreiche Kapside beobachtet werden. In Abbildung 3.16 a wird weiterhin die in infizierten U373MG häufig zu beobachtende Kernsegmentierung deutlich. In allen Zelllinien wies das Zytoplasma eine für HCMV-infizierte Zellen typische deutliche Ausbildung des Viroplasmas (Pfeile) in der Region des Zentrosoms auf (Severi et al., 1988). Das Viroplasma zeichnete sich durch die Konzentration von mit HRP-markierten endosomalen Membranzisternen und durch einer Akkumulation zum Teil umhüllter viraler Partikel aus. Auch diese Strukturen waren bei allen Zelllinien gleichermaßen ausgeprägt.

3.9.2 Untersuchung der nukleären und zytoplasmatischen viralen Vorläuferpartikel

Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung 3.16 machen deutlich, daß die virusinduzierten morphologischen Veränderungen in den AS-Zellen nicht vermindert war. Weiterhin konnten virale Vorläuferpartikel sowohl im Kern als auch im Zytoplasma beobachtet werden. Da mit Hilfe des inhibitorischen Effekts der UL32 AS-mRNA Hinweise auf eine potentielle Rolle von pp150 in der Virion-Morphogenese aufgedeckt werden sollte, wurden diese Partikel im Kern und Zytoplasma im einzelnen genauer untersucht. Die Abbildung 3.17 gibt die Situation in den Zellkernen von U3/RC1 (a), U3/AA32 (c) und U3/AA35 (e) mit den verschiedenen Formen der dort gebildeten Kapsiden wieder. Wie in der Einleitung dargelegt, können ultrastrukturell drei Formen der Kapside unterschieden werden: die B- (frühe), A- (leere) und C- (gefüllte) Kapside. Sie spiegeln die verschiedenen Schritte der Nukleokapsid-Morphogenese wider, wobei die B-Kapside als Vorstufe und die DNA-haltigen elektronendichten C-Kapside als reife nukleäre Zwischenform gelten. Wie in den Abbildung 3.17 a, c und e dargestellt, konnten in Kontroll- und AS-Zellen alle Formen der Kapside, einschließlich der DNA-haltigen C-Kapside, in einer vergleichbaren Anzahl gefunden werden. Die Qualität und Quantität der Kapsidreifung wurde folglich nicht durch die Expression der UL32-AS-mRNA beeinflusst. Demnach war in den AS-Zellen die Synthese der Kapsidbestandteile, die zu den späten Genprodukten zählen, nicht reduziert. Weiterhin konnten keine Hinweise auf eine Störung der Kapsid-Zusammensetzung oder der Verpackung der viralen DNA, deren Synthese - wie oben gezeigt - nicht inhibiert wurde, beobachtet werden. Die ultrastrukturellen Untersuchungen weisen darauf hin, daß trotz der Anwesenheit der AS-mRNA eine reife nukleäre Zwischenform des Vorläufervirions entstehen konnte.

Abbildung 3.17: Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter U3/RC1 (a, b), U3/AA32 (c, d) und U3/AA35 (e, f). Die Bilder geben den Kern (a, c und e) und das Zytoplasma (b, d und f) wieder. Die Großbuchstaben A, B und C bezeichnen die verschiedenen nukleären Kapsidformen. Die Pfeile im Zytoplasma markieren C-Kapside bzw. Virionen, die Pfeilköpfe weisen auf defekte Partikel. Die Balken repräsentieren 200 nm (a, c u. e) bzw. 1µm (b, d u. f). ce, Zentriol

Im Gegensatz dazu traten signifikante Unterschiede in der Morphologie der zytoplasmatischer Partikel in infizierten Kontroll- und AS-Zellen auf (Abbildung 3.17 b, d und f). Im Viroplasma von U3/RC1 (b) konnten

wie auch in U373MG die drei normalerweise in infizierten Zellen zu findenden Formen beobachtet werden. Die DNA-haltigen Virionen, die sich aus den C- Kapsiden ableiten, zeichnen sich durch den elektronendichten Kern aus (Pfeile). Daneben traten Vorläufer auf, die anstelle der DNA noch die innere Kapsidkapsel besaßen und wahrscheinlich direkt aus den nukleären B-Kapsiden entstehen (Pfeilköpfe). Sie werden als sogenannte non-infectious particles (NIEPs) freigesetzt. Die dritte in den Kontrollzellen vertretene Art bilden die dense bodies (DBs), die weder Kapsidstrukturen noch DNA besitzen. Es ist bisher nicht geklärt, ob sie von den nukleären dense bodies abstammen oder erst im Zytoplasma aus Tegumentproteinen zusammengesetzt werden. Alle drei Partikelarten wurden in den Kontrollzellen umhüllt und aus der Zelle freigesetzt. Auch in U3/AA32 (d) und U3/AA35 (f) konnte eine Vielzahl zytoplasmatischer Virus-Partikel gefunden werden. Während NIEPs und dense bodies häufig zu finden waren, konnten DNA-haltige Partikel nur in Einzelfällen nachgewiesen werden. Statt dessen trat eine bisher nicht beschriebene Form von defizienten Partikeln auf, die sich durch einen unregelmäßig geformten, z. T. elektronen- durchlässigen Kern auszeichneten. Diese Partikel waren wie auch die NIEPs von einem Tegument umgeben und wurden vollständig umhüllt. Sie konnten in U3/RC1 nicht beobachtet werden und traten in U373MG auch nicht vor oder nach 3 Tagen nach Infektion auf. Eine Auswahl dieser Partikel aus beiden AS-Zelllinien ist in Abbildung 3.18. e-h den Partikeln aus Kontrollzellen gegenübergestellt (Abbildung 3.18. a-d). Aus den ultrastrukturellen Beobachtungen kann zusammenfassend geschlossen werden, daß sich die Virusreifung in den AS-Zellen U3/AA32 und U3/AA35 von der in Kontrollzellen nur durch die Abwesenheit von DNA-haltigen Virionen im Zytoplasma und durch das Auftreten von defizienten Partikeln unterscheidet. Als Folge der UL32-AS-mRNA Expression muß daher die Hemmung eines Reifungs- oder Transportschrittes zwischen normal entwickelten C- Kapsiden im Nukleus und reifen Virionen im Zytoplasma angenommen werden. Dieser Effekt auf die Entwicklung von DNA-haltigen infektiösen Virionen bietet auch eine Erklärung für die gesenkten Virustiter. Eine generelle Beeinträchtigung der zytoplasmatischen Umhüllungsprozesse kann ausgeschlossen werden, da die beobachteten defizienten Partikel umhüllt wurden.

Abbildung 3.18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von viralen Partikeln im Zytoplasma von Kontrollzellen (U3/RC1, a bis d) und antisense-Zellen (U3/AA35, f bis h). Der Balken gibt 100 nm wieder.

4 DISKUSSION

Das basische Phosphoprotein pp150 des Humanen Zytomegalievirus ist das quantitativ bedeutenste Tegumentprotein des Virions. Obwohl von anderen Tegumentproteinen wie pp71 und pp65 bereits Erkenntnisse über deren Funktion gewonnen werden konnten, liegen bisher keinerlei Hinweise auf die Rolle von pp150 in der Virusreplikation vor. Die Bedeutung seiner Phosphorylierung oder die seiner ungewöhnlichen Modifikation durch O-gebundene N- Acetylglucosamine an zwei Stellen ist bisher völlig ungeklärt. Da es bis auf eine Homologie von 25% zu p100 des humanen Herpesvirus-6 keine Homologien zu Proteinen anderer Herpesviren aufweist, können aus Sequenzanalysen keine Rückschlüsse auf seine Funktion gezogen werden. Die Identifizierung einer wachstumsdefizienten Mutante mit einer Deletion in UL32 spricht dafür, daß es sich bei UL32 um ein essentielles Gen handelt (Zipeto et al., 1993). Da es wie pp71 und pp65 auch im Nukleoplasma lokalisiert werden konnte und Immunfluoreszenzfärbungen von infizierten und transfizierten Zellen es mit der Kernhülle assoziiert zeigen, könnte es an Transport und Umhüllung von Kapsiden beteiligt sein. Ein direkter genetischer Ansatz durch Mutation viraler Gene war bisher für HCMV nur in Einzelfällen gelungen. Deletionsmutationen sind zudem nur für nicht-essentielle Gene möglich, da ein effizientes Zellsystem zur Komplementation und Propagierung von Mutanten nicht zur Verfügung steht. Da der antisense-(AS)-mRNA Ansatz sich bisher als alternative Methodik zur Untersuchung sehr früher und früher Gene erwiesen hat, war es Ziel dieser Arbeit, die Expression von UL32 während der Virusinfektion durch UL32-AS-mRNA exprimierende Zellen zu hemmen, um auf diese Weise Rückschlüsse auf die Funktion von pp150 zu gewinnen. Gleichzeitig sollte geklärt werden, inwieweit die AS-mRNA Inhibitionsmethodik auf späte Gene des HCMV anwendbar ist.

Ein UL32 AS-mRNA exprimierendes Zellsystem

In der vorliegenden Arbeit konnten aus der permissiven Astrozytoma-Zelllinie U373MG stabile Transfektanten hergestellt werden, die die erforderlichen Bedingungen für eine effiziente Suppression der

Abbildung 3.17: Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter U3/RC1 (a, b), U3/AA32 (c, d)

UL32 Expression erfüllten. Es konnten Zelllinien isoliert werden, die den UL32 AS-Expressionsvektor integriert hatten. Diese Zellen waren über den Zeitraum der Untersuchungen (20-30 Passagen) stabil. Die Art der Isolierung der Transfektanten (Verdünnung in Einzelkulturen) macht es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den Linien um Einzelklone handelte, die sich auch für ultrastrukturelle Untersuchungen eignen. Die Tatsache, daß keine Zelllinien isoliert werden konnten, die das transfizierte UL32 3' Fragment exprimierten, deutet darauf hin, daß das verwendete Konstrukt nur schlecht integrierte oder daß die transkribierte mRNA aufgrund ihrer Größe zu instabil war. Die genauen Gründe konnten und sollten in dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden. Es konnten dagegen Zelllinien (U3/AA) isoliert werden, die das UL32 5' Konstrukt integriert hatten. Dieses Fragment deckt im 5' -Bereich etwa 30% der viralen UL32 6.2 kb mRNA ab und schließt die 5' nicht-translatierte Region (NTR) mit ein. Die U3/AA Zelllinien wiesen eine AS-mRNA Menge auf, die bereits durch Northern-Blot-Analyse nachweisbar war. In den oben erwähnten Arbeiten (Dal Monte et al., 1996b, Ripalti et al., 1995) konnte dagegen die UL44 bzw. UL83 AS-mRNA nur durch reverse PCR nachgewiesen werden. Die Expression der rekombinanten UL32-mRNA wurde durch HCMV-Infektion stark hochreguliert, was dafür spricht, daß sie wie erwartet unter Kontrolle des major immediate early promoters (MIEP) stand. Durch diese Bedingung konnte eine für die Hemmung notwendige hohe AS-mRNA Menge erzeugt werden. Zudem konnte durch Strang-spezifische RNA-Sonden gezeigt werden, daß die detektierte rekombinante mRNA in erwarteter Orientierung exprimiert wurde. Mit diesen Transfektanten standen stabile Zelllinien zur Verfügung, die die Hemmung von pp150 möglich machten. Es wurden zwei Linien mit unterschiedlich starker AS-mRNA Expression ausgewählt (U3/AA32 und U3/AA35), um den AS-mRNA Effekt quantitativ zu vergleichen.

Signifikante Hemmung der UL32 Expression

Durch Northern-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß die Gleichgewichtsmenge an viraler UL32 mRNA nach HCMV Infektion in beiden untersuchten AS-Zelllinien signifikant reduziert wurde. Die quantitative Auswertung ergab eine Reduktion der 6.2 kb UL32 mRNA von 75% bzw. 85% gegenüber der Vektor-Kontrollzelllinie 3 Tage p.i. Die unterschiedlich starke Hemmung spiegelte die unterschiedlich starke Expression von AS-mRNA in den beiden Zelllinien wider. Die Bestimmung der mRNA-Gleichgewichtsmenge gibt jedoch das Ausmaß der Expressions-Hemmung eines Gens nur zum Teil wieder, da die Degradation der Ziel- mRNA nur eine Möglichkeit der Inhibition ist. Zusätzlich können sich aus AS-mRNA und Ziel-mRNA auch stabile RNA:RNA Duplices bilden, die ebenfalls die Translation hemmen (Kim & Wold, 1985), aber in einem denaturierenden RNA-Gel nicht dargestellt werden können. Auf der anderen Seite wäre denkbar, daß die Translation der verbleibenden mRNA durch posttranskriptionale Mechanismen hochreguliert würde. Für den experimentellen Ansatz dieser Arbeit war es demnach entscheidend, ob die Protein-Synthese von pp150 gehemmt würde. Daher wurde die Syntheserate von pp150 3 Tage nach Infektion durch Immunpräzipitation quantitativ ausgewertet. Die Quantifizierung zeigte, daß die UL32 Expression auch auf der Ebene der Translation stark reduziert wurde (80% bzw. 90%). Der Grad der Inhibition korrelierte mit dem der mRNA Reduktion, was darauf hinweist, daß die Hemmung der Proteinsynthese eine direkte Folge der mRNA Degradation darstellte. Der erzielte Inhibitionseffekt konnte als signifikant angesehen werden und stellt im Vergleich zu anderen Arbeiten einen guten Wirkungsgrad dar (Murray & Crockett, 1992).

Selektivität der Wirkung von UL32-antisense-mRNA

Bei dem Einsatz von AS-mRNA zur Inhibition eines Gens wurden häufig Effekte in der Zelle beobachtet, die zur unspezifischen Hemmung anderer Gene führten (Murray & Crockett, 1992). Diese Tatsache kann zu einer falschen Beurteilung des Experiments führen. Es muß daher zunächst diskutiert werden, ob die Reduktion der viralen UL32 mRNA in infizierten UL32 AS-Zellen auf eine direkte Einwirkung der AS-mRNA zurückzuführen ist, d. h. auf die intrazelluläre Hybridisierung beider mRNA Spezies und ihre anschließende Degradation (Nellen & Lichtenstein, 1993). Eine Reihe von Beobachtungen weisen auf diesen Mechanismus hin. Erstens spiegelt sich der unterschiedliche Grad der Reduktion in den beiden AS-Zelllinien in deren Fähigkeit wider, AS-mRNA zu exprimieren. Die stark exprimierende Zelllinie U3/AA35 erreicht eine 10% größere Reduktion der viralen UL32 mRNA als die schwächer exprimierende U3/AA32. Obwohl die AS-mRNA Menge und die Reduktion der Ziel-mRNA nicht in einem linearen Zusammenhang stehen, weist diese Beobachtung auf eine direkte Wirkung hin. Dieser Zusammenhang konnte außerdem durch die

Titrierung beider mRNA Spezies durch eine Steigerung der viralen Dosis bei der Infektion von AS-Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurde die Zelllinie U3/AA35 mit steigender Multiplizität infiziert und die Menge beider mRNAs in einer Northern-Blot-Analyse untersucht. Unter diesen Bedingungen konnte die Expression der viralen mRNA durch steigende Virusgenomdosis erhöht werden. Da die Menge des AS-Expressionskonstruktes in den infizierten Zellen jedoch als stabil angesehen werden konnte, nahm dadurch das sense/AS-mRNA Expressions- verhältnis stark zu. Geht man nach der Theorie zur Wirkung von AS-mRNA davon aus, daß beide mRNAs durch Duplexbildung und Degradation verbraucht werden, sollte bei steigender Multiplizität die Menge der verbleibenden viralen Ziel-mRNA steigen, die der AS-mRNA jedoch abnehmen. Diese Überlegung konnte experimentell tatsächlich nachgewiesen werden, was eine direkte Wirkung der UL32 AS-mRNA auf die virale UL32 mRNA sehr wahrscheinlich macht. In die gleiche Richtung weist die Beobachtung, daß die Wirkung der AS-mRNA auf die Freisetzung infektiöser Viren bei hoher Multiplizität wesentlich geringer ausfiel als bei niedriger Multiplizität. Auch hier kann davon ausgegangen werden, daß die exprimierte Menge von AS-mRNA bei hoher viraler Dosis nicht ausreicht, um eine signifikante Reduktion der Virusproduktion auszulösen. Umgekehrt zeigte die nur unwesentliche Hemmung der Virusproduktion bei hoher infektiösen Dosis, daß in den AS-Zelllinien kein genereller unspezifischer Block der Virusreplikation vorliegt.

Gleichzeitig machen diese Experimente deutlich, daß es bei Hemmung eines viralen Gens durch AS-mRNA bestimmte Bedingungen gibt, bei denen die Wirkung des hemmenden Agens optimal nachgewiesen werden kann. Diese Bedingungen beziehen sich vor allem auf die Multiplizität der Infektion und den Meßzeitpunkt nach Infektion. Sie wurden im Verlauf der Untersuchungen für alle Experimente eingehalten, um die Ergebnisse miteinander vergleichbar zu machen. Diese Tatsache unterscheidet sich von Inhibitionsexperimenten zellulärer Gene, da deren Expression in Regel konstant bleibt.

Ein wichtiges Kriterium für die Spezifität des UL32 AS-mRNA Effektes ist die Frage, ob neben UL32 andere Gene koinhibitiert wurden. Durch Immunpräzipitation wurde deutlich, daß außer pp150 auch das späte Genprodukt gB (gpUL55) 3 Tage p.i. in seiner Expression gehemmt wurde. Dessen Hemmung fiel zwar mit 60% bzw. 70% geringer aus als die von pp150, war jedoch immer noch signifikant. Die Messung der UL55 mRNA Gleichgewichtsmengen konnte zeigen, daß deren Reduktion geringer ausfiel (17% bzw. 37%) und damit nicht mit der Inhibition der Proteinsynthese korrelierte wie im Fall von pp150. Es konnte außerdem keine Sequenzhomologie zwischen UL55 und UL32 gefunden werden, was eine Degradation der UL55 mRNA durch AS-mRNA ermöglichen würde. Diese Daten lassen darauf schließen, daß gB nicht durch die direkte Einwirkung der AS-mRNA reduziert wurde, sondern durch einen indirekten Mechanismus vor allem auf der Ebene der Translation. Eine mögliche Erklärung könnte die Erkenntnis bieten, daß späte Proteine des HCMV durch posttranslationale Mechanismen reguliert werden können (Geballe et al., 1986). Es ist denkbar, daß ein solcher Regulationsmechanismus durch die Suppression von pp150 beeinflusst wird.

Neben gB wurde auch die Expression des Tegumentproteins pp65 in der späten Phase untersucht. Die Synthese dieses Proteins wurde nur in einer der beiden Zelllinien (U3/AA35) beeinflusst, aber zu einem wesentlich geringeren Grade (20%) als gB. Demnach kann gesagt werden, daß die Transkription der AS-mRNA keine generelle Hemmung der Proteinsynthese auslöste. Weiterhin ist es von Bedeutung, daß die Synthese von ppUL44 als frühes Protein in der frühen Phase nicht beeinflusst wurde. Diese Beobachtung ist für die Frage der Spezifität des AS-mRNA Effektes deshalb entscheidend, weil 1 Tag p.i. zum Zeitpunkt der Messung der UL44 Synthese die UL32 AS-mRNA bereits hochreguliert war. Sie übte demnach keinen direkten inhibitorischen Effekt auf die virale Proteinsynthese aus. Die Untersuchungen zur Proteinbiosynthese der viralen Proteine in infizierten AS-Zellen zeigten also, daß zwar neben pp150 auch ein anderes virales Protein in der späten Phase gehemmt wurde, sie deuteten aber auch darauf hin, daß dieser Effekt auf die späte Phase beschränkt blieb.

Die Feststellung, daß frühe Gene unbeeinflusst blieben, konnte dadurch bestätigt werden, daß die virale DNA-Synthese in AS-Zellen nicht reduziert wurde. Die Replikation des Virus- Genoms ist von einer Vielzahl früher Gene abhängig und sollte messbar abgesenkt werden, wenn einer der Faktoren gehemmt wird. In die gleiche Richtung weisen die morphologischen Beobachtungen, die zeigten, daß in AS-Zellen die frühen nukleären Ereignisse der Virus- Replikation und Kapsidbildung nicht gestört wurden.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß die UL32 AS-mRNA spezifisch mit der viralen UL32 mRNA interagiert und die Degradation beider mRNA Spezies auslöst. Die Hemmung anderer Gene ist auf die späte Phase beschränkt. Deren Inhibition erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Translation, was darauf hindeutet, daß hier post- transkriptionale Regulationsmechanismen beeinflusst werden, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Suppression von pp150 stehen könnten.

Homologe Kosuppression

In der Diskussion bisher unberücksichtigt blieb der Effekt, den die Transkription des rekombinanten UL32 sense-Konstruktes auf die Expression von UL32 ausübte. Isoliert und untersucht wurde die Zelllinie U3/SA9, die dasselbe UL32 Fragment wie die AS-Zellen in sense-Orientierung exprimiert. In dieser Zelllinie wurde die UL32 Expression auf der Ebene der Transkription und Translation in ähnlich großem Ausmaß gehemmt wie in den AS-Zellen, weshalb sie als Kontrolle ungeeignet war und für weiter-gehende Experimente nicht herangezogen wurde. Der Effekt, daß die Expression eines Genfragments ebenfalls inhibitorische Wirkung aufweisen kann, wurde in vielen Fällen beobachtet und wurde als Kosuppression bezeichnet (Jorgensen, 1990). Eine mögliche Erklärung im Fall von U3/SA9 könnte darin gesehen werden, daß ausgehend von dem transfizierten Expressionskonstrukt pRc-Apa/S eine trunkierte Form von pp150 (Aminosäure 1 - 664) exprimiert werden könnte, die über negative Rückkopplung die Expression des authentischen pp150 inhibiert. Eine trunkierte Form von pp150 konnte jedoch weder durch Immunfluoreszenzfärbung noch durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Endogene Heterogenität von U373MG

Die Zelllinie U373MG bildet eine heterogene Population von Astrozytoma-Zellen. Durch die Art der Isolierung von Einzelklonen bei der Herstellung von AS-mRNA exprimierenden Zelllinien könnten Einzelklone isoliert werden, die sich in ihrer Permissivität gegenüber der HCMV Replikation im Vergleich zu den Ausgangszellen oder den isolierten Kontrollzellen stark unterscheiden. Die unterschiedliche Expression viraler Gene in Kontroll- und AS-Zellen könnte demnach auch durch endogene Heterogenität einzelne Zellklone hervorgerufen werden und wäre deshalb keine direkte Folge der Expression von UL32 AS-mRNA. Diesem Kritikpunkt konnte durch die Untersuchung von jeweils vier weiteren Kontroll- und AS-Zellen entgegengetreten werden. Die Expression von pp150 war in allen AS-Zelllinien signifikant reduziert gegenüber der durchschnittlichen pp150 Expression in den Kontrollzellen. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die ausgewählten Zelllinien U3/AA32 und U3/AA35 die Synthese von pp150 nicht zufällig durch endogene Faktoren supprimieren, sondern durch die Expression der UL32 AS-mRNA.

Antivirale Faktoren

Seit langem ist bekannt, daß die intrazelluläre Bildung von doppelsträngiger RNA die Sekretion von Interferonen in diesen Zellen induziert (Lampson et al., 1967). Die Interferon Induktion bildet den ersten Schritt eines zellulären Abwehrsystems, das die Replikation von Viren, vor allem von RNA-Viren, verhindert. Interferon-induzierte Genprodukte, die an der viralen Abwehr beteiligt sind, schließen die dsRNA-abhängige Protein Kinase PKR und die 2- 5A-Oligo-Adenylate Synthetase ein. Die PKR phosphoryliert den eukaryontischen Initiationsfaktor 2a (eIF2a) und blockiert damit die Proteinsynthese (Katze, 1995). Die 2- 5A-Oligo-Adenylate-Synthetase synthetisiert 2 ,5 -gekoppelte Oligoadenylate, die die Aktivität der RNase L hochreguliert und damit die Degradation zellulärer RNA induziert (Kerr & Brown, 1978). Beide Faktoren werden nicht nur durch Interferon induziert, sondern werden außerdem posttranslational durch dsRNA aktiviert. Die aus sense- und AS-mRNA gebildeten Duplices in HCMV-infizierten AS-Zellen könnten also diesen Mechanismus hervorgerufen und die beobachtete Suppression der Expression später Gene in diesen Zellen ausgelöst haben. In diesem Fall wäre der inhibitorische Effekt nicht direkt durch die Neutralisierung der viralen UL32 mRNA verursacht worden. Weiterhin ist bekannt, daß Tumorzellen verstärkt Faktoren wie den Tumornekrosefaktor (TNF) sezernieren. Von TNF ist bekannt, daß er in Synergie mit Interferon einen Block der späten Phase der HCMV- Replikation auslöst (Lucin et al., 1994).

In dieser Arbeit konnte zwar aufgedeckt werden, daß mock- und HCMV-infizierte AS-Zellen Faktoren

freisetzen, die in einem standardisierten System Schutz vor VSV-Infektion übertragen können. Die Werte lagen aber nicht signifikant über denen der Kontrollzellen und konnten somit nicht als Erklärung für den unterschiedlichen Effekt auf die HCMV- Genexpression in Kontroll- und AS-Zellen dienen. Weiterhin erscheint es aus folgenden Überlegungen unwahrscheinlich, daß die Wirkung löslicher antiviraler Faktoren der Grund für die beobachteten Effekte auf die HCMV Replikation in infizierten AS-Zellen sein könnte. Die Überstände infizierter AS-Zellen wurden auf ihre protektive Wirkung auf U373MG und HFF hin untersucht. Keiner der Überstände vermittelte Schutz vor HCMV-Infektion und senkte damit die Virustiter in den damit vorinkubierten Zellen. Die Überstände hatten damit nicht die Fähigkeit, die Virusproduktion in der Weise zu hemmen, wie es in AS-Zellen beobachtet wurde. Diese funktionelle Untersuchung wurde angewendet, um auch synergistische Effekte verschiedener Cytokine zu berücksichtigen. Weiterhin unterscheidet sich der von Lucin et al. (1994) durch TNF und IFN ausgelöste Effekt entscheidend von dem durch UL32 AS-mRNA ausgelösten. Durch Cytokin-Behandlung wurde die virale DNA Synthese um den Faktor 5-10 reduziert, wogegen sie in den AS-Zellen unbeeinflusst blieb. Außerdem wurde die Morphogenese der Kapside bereits im Kern gestört, in den hier untersuchten Zellen konnten abnorme Formen jedoch nur im Zytoplasma beobachtet werden. Und zum dritten wurden nicht alle Gene gleichermaßen betroffen, pp65 nur sehr gering, was gegen eine generelle Suppression der Proteinbiosynthese spricht.

Beurteilung des antisense-mRNA-Ansatzes für die Untersuchung später Gene des HCMV

Wie zu Beginn erläutert, existiert derzeit kein direktes genetisches System für die Untersuchung von essentiellen Genen des HCMV. Nachdem in anderen Arbeiten sehr frühe (Bryant & Sinclair, 1993) und frühe Gene (Ripalti et al., 1995; Dal Monte et al., 1996b) erfolgreich durch AS-mRNA gehemmt wurden, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, das späte Gen für pp150 zu inhibieren.

Der Ansatz, ein spätes Gen zu hemmen, unterscheidet sich jedoch grundlegend von den vorangegangenen Arbeiten, da der beobachtete Effekt differenzierter beurteilt werden muß. Es ist bekannt, daß bei Hemmung der viralen DNA-Synthese die Expression später Gene blockiert wird. Diesen Effekt kann man daher auch für die Inhibition eines essentiellen sehr frühen oder frühen Gens erwarten. Die Frage nach der Selektivität der Hemmung stellt sich daher nicht. Bei Hemmung von pp150 konnte dagegen nicht abschließend geklärt werden, ob die Reduktion von gB als Folge der Suppression von pp150 aufgrund einer regulativen Verbindung zwischen den späten Genen gewertet werden kann. Es wäre daher von Interesse zu klären, ob dieser Effekt auch bei Hemmung anderer Gene, z. B. von gB, auftritt. Andererseits bot die Hemmung des späten Proteins pp150 die Möglichkeit, daß Replikation und Morphogenese weiter fortschreiten konnten. Die dabei entstehenden Reifungsintermediate erlaubten nähere Rückschlüsse auf die Funktion des untersuchten Genprodukts.

In bezug auf die Methodik hat diese Arbeit gezeigt, daß der AS-mRNA-Ansatz - wie in den folgenden Abschnitten erläutert - zwar keine eindeutige Klärung der Funktion eines späten Gens erreichen kann und daher ein direkter genetischer Ansatz nicht ersetzt werden kann, es konnten jedoch hilfreiche Hinweise auf die beteiligten Prozesse gewonnen werden.

Auswirkung der UL32 AS-mRNA Aktivität auf Morphogenese und Freisetzung von Virionen.

Bisher wurden die Wirkungen der UL32-AS-mRNA und deren Spezifität auf die Expression von pp150 und anderer viraler Proteine diskutiert. Als Folge dieser direkten Auswirkung der AS-mRNA konnte eine signifikante Reduktion der viralen Titer in AS-mRNA exprimierenden Zellen festgestellt werden. Die Reduktion betrug bei optimalen Bedingungen 2-3 Größenordnungen. Diese Reduktion war, wie oben erwähnt, abhängig von der viralen Infektionsdosis und damit auf die Wirkung der UL32 AS-mRNA zurückzuführen. Dies zeigt, daß die Titerbestimmung eine geeignete Größe darstellt, um den Effekt in den AS-Zellen zu erfassen. Die Bestimmung der Titer erfolgte durch Messung von infektiösen Einheiten. Dadurch werden nur infektiöse Virionen, nicht aber die Gesamtzahl freigesetzter Partikel einschließlich defizienter Virionen, NIEPs oder dense bodies erfaßt. Die signifikante Senkung der Titer zeigte in dramatischer Weise, daß die Wirkung der UL32 AS-mRNA mit essentiellen Mechanismen der Reifung und Produktion infektiöser Virionen interferierte.

Um den Schritt viraler Morphogenese genauer einzugrenzen, den die Expression der UL32 AS-mRNA störte und dessen Beeinträchtigung zur stark herabgesetzten Freisetzung infektiöser Virionen führte, wurden ultrastrukturelle Untersuchungen durchgeführt. Eine objektive Auswertung wurde dadurch gewährleistet, daß sie unter Doppelblindbedingungen stattfand. So wurden morphologische Daten gesammelt, ohne daß der Betrachter während der Untersuchung wußte, ob es sich bei dem Präparat um Kontroll- oder AS-Zellen handelte. Morphologische Auswertungen in U373MG müssen zudem kritisch betrachtet werden, da die HCMV Replikation in diesen Zellen durch das Auftreten von weniger viralen Vorläuferpartikeln gekennzeichnet ist als in primären Fibroblasten. Dadurch können bereits in Kontrollzellen größere Schwankungen in der Zahl der viralen Partikel auftreten. Die morphologischen Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede zwischen Kontroll- und AS-Zellen waren jedoch so offensichtlich und reproduzierbar, daß sie als signifikant angesehen werden können. Diese Beobachtungen sollen hier zunächst im einzelnen dargestellt werden, um ihre Bedeutung für die Beurteilung der Ergebnisse zu erläutern.

Zunächst bestätigte der Vergleich zwischen der Vektorzelle U3/RC1 und den ursprünglichen U373MG die biochemischen und virologischen Untersuchungen, daß die Transfektion mit dem Vektor pRC/CMV alleine keine Beeinträchtigung der Morphogenese hervorruft. Auch in den AS-Zelllinien konnten alle morphologischen Veränderungen beobachtet werden, die mit der HCMV-Infektion verbunden sind und als zytopathischer Effekt zusammengefaßt werden. Dazu gehört die Ausbildung des nukleären Skeins und des zytoplasmatischen Viroplasmas mit der Akkumulation von viralen Partikeln und Membranzisternen in der Region des Zentrosoms. Eine entscheidende Beobachtung war außerdem, daß die Morphogenese der nukleären Kapside sich weder qualitativ noch quantitativ in AS-Zellen unterschied. Insbesondere konnten DNA-haltige C-Kapside in gleicher Anzahl gefunden werden. Dies zeigt zum einen, daß die genomische Virus-DNA, deren Synthese als frühes Ereignis nicht gehemmt wurde, korrekt in Kapside verpackt werden konnte. Zum anderen wurden auch dafür notwendige späte Ereignisse wie die Synthese der Kapsidproteine offensichtlich nicht gehemmt. Als einzige morphologisch erfaßbare, jedoch sehr entscheidende Folge der Expression kann das Fehlen von DNA-haltigen Virionen im Zytoplasma gewertet werden. Damit unterscheidet sich das morphologische Erscheinungsbild grundlegend von den Ergebnissen, die mit UL83 AS-mRNA exprimierenden Zellen erreicht wurden (Dal Monte et al., 1996b). In diesen Zellen wurde, wahrscheinlich durch die Koinhibition der pp71-Biosynthese, ein früher Block der Kapsid-Reifung ausgelöst, wodurch keine nukleären C-Kapside auftraten.

Die starke Verminderung der Zahl DNA-haltiger Virionen im Zytoplasma von UL32 AS-mRNA exprimierenden Zellen kann eindeutig als Erklärung für die Absenkung der Virus-Titer in AS-Zellen aufgefaßt werden, da der Transport der DNA-haltigen Vorläufer-Virionen ins Zytoplasma einen notwendigen Zwischenschritt in der Reifung der Virionen bildet. Jedoch kann dies nicht als eine generelle Hemmung des viralen Partikeltransportes vom Kern ins Zytoplasma gedeutet werden, da die normalerweise auftretenden defizienten Partikel, NIEPs und dense bodies, in unveränderter Zahl vorgefunden werden konnten. Neben diesen defizienten Partikeln wurde eine abnorm geformte Art von Kapsiden und Vorläufervirionen im Zytoplasma beobachtet, die in normalen U373MG oder HFF bisher nicht beschrieben wurden. Eine Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten dieser Partikel und das Fehlen der DNA-haltigen Virionen, könnte sein, daß sich diese Partikel durch Störung bestimmter Reifungsschritte von den nukleären C-Kapsiden ableiten.

Mögliche Funktionen von pp150

Die Tatsache, daß neben pp150 auch gB in seiner Expression inhibiert wurde, macht es schwierig, die beobachteten Effekte allein einer Hemmung von pp150 zuzuordnen. Da die Expression von pp150 aber stärker als die anderer untersuchter viraler Gene inhibiert wurde, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Hemmung von pp150 entscheidend zu den beobachteten Störungen der viralen Morphogenese beigetragen hat. Die in UL32 AS-Zellen beobachtete Diskrepanz zwischen der normalen Morphogenese nukleärer Kapside und dem Fehlen DNA-haltiger Vorläuferpartikel im Zytoplasma kann auf zweierlei Weise mit einer möglichen Funktion von pp150 in Verbindung gebracht werden: mit einer Funktion im nukleo-zytoplasmatischen Transport oder in der Stabilisierung von Kapsiden.

Es ist bisher noch nicht abschließend geklärt, ob Kapside bereits im Kern wenigstens zum Teil ein Tegument erhalten, oder ob die Tegumentierung erst im Zytoplasma erfolgt. Da neben pp65 und pp71 auch pp150 im Kern infizierter Zellen nachgewiesen werden konnte (Hensel et al., 1995), kann man vermuten, daß es in ein nukleäres Tegument integriert wird. Wenn das zutrifft, könnte es während der Transportknospung viraler Partikel durch die Kernhülle eine essentielle Rolle spielen. Eine Beteiligung in diesem Prozeß wird außerdem durch die Immunfluoreszenz-Lokalisation von pp150 in Assoziation mit der Kernmembran unterstützt. Eine Herabsetzung der pp150-Synthese würde mit dieser Funktion interferieren und verhindern, daß Virionen ins Zytoplasma transportiert würden. Dieser Zusammenhang könnte zwar das Fehlen zytoplasmatischer Virionen erklären, es bliebe jedoch offen, warum defiziente Partikel von diesem Transportblock nicht betroffen sind. Diese Frage ist vor allem problematisch, da NIEPs fast die gleiche Zusammensetzung wie Virionen besitzen (Irmieri & Gibson, 1983) und deshalb wahrscheinlich durch den gleichen Mechanismus transportiert werden.

Die zweite Erklärungsmöglichkeit impliziert eine Funktion von pp150 in der Stabilisierung von C-Kapsiden. Der Aufbau und die Reifung von Kapsiden beginnt im Kern mit der Assemblierung von B-Kapsiden (Gibson, 1993; Rixon, 1993). B-Kapside besitzen zunächst eine innere Kapsel, die vor allem aus dem assembly protein besteht und als Konstruktionsgerüst für den Zusammenbau der Kapsidproteine angesehen wird. Diese Kapsel wird im Verlauf der Reifung durch die Serinprotease assembliert gespalten und abgebaut. Anschließend entstehen durch den Einbau des Virusgenoms die elektronendichten DNA-haltigen C-Kapside. Wahrscheinlich läuft dieser Prozess über die Zwischenstufe der elektronen-hellen A-Kapside ab. Durch den Abbau der inneren Kapsel könnte das Kapsid an Stabilität verlieren, die es erst durch das sich anlagernde Tegument wiedererlangt. Es ist bekannt, daß pp150 besonders eng mit dem Kapsid assoziiert ist (Gibson, 1993). Daher könnte gerade diesem Tegumentprotein eine besondere Rolle in der Vermittlung der Kapsidstabilität zukommen. Mangelnde Stabilität durch das Fehlen von pp150 in UL32 AS-Zellen würde die Desintegration gerade der DNA-haltigen Kapside während des Transports in Zytoplasma auslösen und die beobachteten abnormen Kapsid-Formen hervorrufen. Ein struktur- vermittelnder bzw. -erhaltender Einfluß auf das Kapsid wäre eine neuartige Funktion eines Tegumentproteins, die dem Tegument bisher noch nicht zugeschrieben werden konnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der offene Leserahmen UL32 des humanen Zytomegalievirus (HCMV) kodiert für das basische Phosphoprotein pp150 (ppUL32), das den Hauptbestandteil des Virionteguments bildet. Um die mögliche Rolle von pp150 im Zusammenbau und dem Transport von viralen Vorläuferpartikeln zu untersuchen, wurden Astrozytom-Zelllinien (U373MG) erzeugt, die stabil ein 2,1 kb 5' Fragment von UL32 in antisense-Orientierung unter der Kontrolle des HCMV major immediate early promoter exprimieren. Die mRNA-Gleichgewichtsmenge der viralen UL32 sense-mRNA und die pp150 Proteinsynthese wurden in infizierten antisense-Zellen stark reduziert. Die Expression der sehr frühen und frühen Gene und die virale DNA-Replikation wurden nicht inhibiert. Dagegen wurde die Expression des späten Genprodukts gB (gpUL55) ebenfalls reduziert, jedoch im Gegensatz zu pp150 vornehmlich auf dem Niveau der Translation. Kontroll-Experimente zeigten, daß dieser differentielle Effekt der UL32- antisense-Expression auf die Synthese viraler Proteine spezifisch war. Der antisense-mRNA- Ansatz erwies sich damit als geeignet zur Untersuchung von späten Genen des HCMV. Als Konsequenz des inhibitorischen Effektes wurde der Virustiter in antisense-mRNA-Zelllinien signifikant reduziert. Der ultrastrukturelle Vergleich von Kontroll- und antisense-Zellen machte deutlich, daß kein Unterschied zwischen der Zahl und der Form von nukleären Nukleokapsiden bestand. Im Zytoplasma von antisense-Zellen wurde dagegen eine stark gesenkte Anzahl von DNA-haltigen C-Kapside oder Virionen gefunden, stattdessen wurden abnorme Formen von NIEPs beobachtet. Somit interferiert die Expression von UL32- antisense-mRNA entscheidend mit der Virusreifung in der späten Phase des Infektionszyklus. Die Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von pp150 entweder im Transport von DNA-haltigen Partikeln durch die Kernhülle oder in der Stabilisierung von Kapsiden im Zytoplasma schließen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alford, C. A. & Britt, W. J. (1993). Cytomegalovirus. In *The Herpesviruses*, S. 227-255. B. Roizman, R. J. Whitley & C. Lopez (Ed.). New York: Raven Press.
- Baldick, C. J., Jr. & Shenk, T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* 70, 6097-105.
- Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Chee, M. S., Hutchinson, C. A., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Satchwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M. & Barrell, B. G. (1991a). The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq* 2, 1-12.
- Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Chee, M. S., Hutchison, C. A. d., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E. (1991b). The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq* 2, 1-12.
- Bogner, E., Stinski, M. F. & Radsak, K. (in Vorbereitung). DNA binding properties of the gene product of human cytomegalovirus UL56. .
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W. & Radsak, K. (1996). Structural domains involved in Human Cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) mediated cell-cell fusion. *J. Gen. Virol.* 77, 2297-2302.
- Brand, G., Kern, H. F. & Hensel, G. M. (in Vorbereitung). Human cytomegalovirus (HCMV) infection of human fibroblasts leads to spatial reorganisation of early endosom and Golgi cisternae.
- Brown, T. A. (1990). *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Bryant, L. A. & Sinclair, J. H. (1993). Inhibition of human cytomegalovirus major immediate early gene expression by antisense RNA expression vectors. *J Gen Virol* 74, 1965-7.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchinson, C. A., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Satchwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M. & Barrell, B. G. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154, 125-169.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsa, L. (1972). Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114.
- Compton, T., Nepumoceno, R. R. & Nowlin, D. M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 191, 387- 395.
- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. (1993). Initiation of Human Cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834- 841.
- Cornelissen, M. (1989). Nuclear and cytoplasmic sites for anti-sense control. *Nucleic Acids Res.* 17, 7203-7209.
- Dal Monte, P., Bessia, C., Landini, M. P. & Michelson, S. (1996a). Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in stable cell line and its association with the metaphase chromosomes. *J. Gen. Virol.* 77, 2591-2596.
- Dal Monte, P., Bessia, C., Ripalti, A., Landini, M. P., Topilko, A., Plachter, B., Virelizier, J. L. & Michelson, S. (1996b). Stably expressed antisense RNA to cytomegalovirus UL83 inhibits viral replication. *J Virol* 70, 2086-94.

- Deutscher, M. P. (1990). Guide to protein purification. In *Methods in Enzymology*. San Diego, CA, USA: Academic Press, inc.
- Duclos, H., Elfassi, E., Michelson, S., Arenzana-Seisdedos, F., Munier, A. & Virelizier, J.-L. (1989). Cytomegalovirus infection and trans-activation of HIV-1 and HIV-2 LTR in human astrocytoma cells. *AIDS Res. Human Retroviruses* 5, 217-224.
- Eggers, M., Bogner, E., Agricola, B., Kern, H. F. & Radsak, K. (1992). Inhibition of human cytomegalovirus maturation by brefeldin A. *J. Gen. Virol.* 73, 2679-2692.
- Epstein, L. B., McManus, N. H., Hebert, S. J., Woods-Hellman, J. & Oliver, D. G. (1981). Microtiter assay for antiviral effects of human and murine interferon utilizing a vertical light path photometer for quantitation. In *Methods for studying mononuclear phagocytes*, S. 619-628.
- Fleckenstein, B., Müller, I. & Collins, J. (1982). Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* 18, 39-46.
- Geballe, A. P., Leach, F. S. & Mocarski, E. S. (1986). Regulation of cytomegalovirus late gene expression: genes are controlled by postranscriptional events. *J. Virol.* 57, 864- 874.
- Gibson, W. (1983). Protein counterparts of human and simian cytomegalovirus. *Virology* 128, 391-406.
- Gibson, W. (1993). Molecular biology of human cytomegalovirus. In *Molecular aspects of human cytomegalovirus*, S. 303-329. Y. Becker & G. Darai (Ed.). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Gibson, W. (1996). A "picture" is worth a thousand experiments. *Nature Medicine* 2, 1193- 1194.
- Giraldo, G., Beth, E. & Huang, E. S. (1980). Kaposi's sarcoma and its relationship to Cytomegalovirus. III: Cytomegalovirus DNA and Cytomegalovirus early antigens in Kaposi's sarcoma. *Int. J. Cancer* 26, 23-29.
- Greis, K. D., Gibson, W. & Hart, G. W. (1994). Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *J Virol* 68, 8339-49.
- Gupta, P., Joer, S. & Rapp, F. (1977). Comparison of the polypeptides of several strains of Human Cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 34, 447-454.
- Hanahan, P. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 577-580.
- Hensel, G., Meyer, H. H., Gärtner, S., Brand, G. & F., K. H. (1995). Nuclear localization of the human cytomegalovirus tegument protein pp150 (ppUL32). *J Gen Virol* 76, 1591- 1601.
- Hensel, G., Meyerh, H. H., Buchmann, I., Schmolke, S., Plachter, B., Radsak, K. & Kern, H. F. (1996). Intracellular localisation and expression of the human cytomegalovirus matrix phosphoprotein pp71 (ppUL82): evidence for its translocation into the nucleus. *J Gen Virol* 77, 3087-3097.
- Ho, M. (1982). Cytomegalovirus, biology and infection. W. B. Greenough & T. C. Merigan (Ed.). New York: Plenum Medical Book Company.
- Irmieri, A. & Gibson, G. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of catomegalovirus. *Virology* 130, 118-133.
- Jahn, G., Kouzarides, T., Mach, M., Scholl, B. C., Plachter, B., Traube, B., Preddie, E., Satchwell, S. C., Fleckenstein, B. & Barell, B. G. (1987). Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human catomegalovirus. *J Virol* 61, 1358-1367.

- Jones, T. R. & Muzithras, V. P. (1992). A cluster of dispensable genes within the human cytomegalovirus genome short component: IRS1, US1 through US5, and the US6 family. *J Virol* 66, 2541-6.
- Jorgensen, R. (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.* 8, 340-344.
- Kaerber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480.
- Katze, M. G. (1995). Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope? *Trends Microbiol.* 3, 75-78.
- Keay, S., Merigan, T. C. & Rasmussen, L. (1989). Identification of cell surface receptors for the 86-kilodalton glycoprotein of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10100-3.
- Kerr, I. M. & Brown, R. E. (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 256-260.
- Kim, K. S., Sapienza, V. J., Carp, R. I. & Moon, H. M. (1976). Analysis of structural polypeptides of purified human cytomegalovirus. *J. Virol.* 20, 604-611.
- Kim, S. K. & Wold, B. J. (1985). Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of antisense RNA. *Cell*, 129-138.
- Klöckl, T., Meyer, H., Weber, M., Kern, H. F. & Hensel, G. M. (in Vorbereitung). Morphogenesis of human cytomegalovirus (HCMV) is inhibited at various stages of maturation in astrocytoma cells compared to HCMV replication in human fibroblasts. .
- Klof, M. (1983). Zytomegalie-Virus-Infektion. *Fortschr. Med.* 101, 1155-1160.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lampson, G. P., Tytell, A. A., Field, A. K., Nemes, M. M. & Hilleman, M. R. (1967). Inducers of interferon and host resistance: I. Double-stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 782-786.
- Landini, M. P., Severi, B., Furlini, G. & Badiali De Giorgi, L. (1987). Human cytomegalovirus structural components: intracellular and intraviral localization of p28 and p65-69 by immunoelectron microscopy. *Virus Res.* 8, 15-23.
- Landini, M. P. & Spaete, R. P. (1993). Human Cytomegalovirus structural proteins: a report of the first nomenclature workshop. In *Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease.*, S. 65-74. S. Michelson & S. A. Plotkin (Ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Leland, D. S. & French, M. L. (1988). Virus Isolation and Identification. In *Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases*, S. 40-59. E. H. Lenette, P. Halonen & F. A. Murphy (Ed.). New York: Springer-Verlag.
- Liu, B. & Stinski, M. F. (1992). Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* 66, 4434-44.
- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H. & Koszinowski, U. H. (1994). Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon- gamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol* 75, 101-10.

- Macher, A., Reichert, C., Straos, S., Longo, D., Parillo, J., Lane, H., Fauci, A., Rook, A., Manischewitz, J. & Quinnan, G. (1983). Death in the AIDS patient: Role of Cytomegalovirus. *N. Engl. J. Med.* 309.
- Meyer, H., Bankier, A., Landini, M. P., Rüger, B. & Mach, M. (1988). Identification and prokaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28 kDa structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 62, 2243-2250.
- Mocarski, E. S. (1993). Cytomegalovirus biology and replication. In *The human herpesviruses*, S. 173-226. B. Roizman, R. J. Whitley & C. Lopez (Ed.). New York: Raven press.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2), 55-63.
- Murray, J. A. H. & Crockett, N. (1992). Antisense techniques: an overview. In *Antisense RNA and DNA*, S. 1-49. J. A. H. Murray (Ed.). New York: Wiley-Liss, Inc.
- Nellen, W. & Lichtenstein, C. (1993). What makes an mRNA anti-sense-itive? *Trends Biochem Sci* 18, 419-23.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1, 841-845.
- Peeples, M. E. (1991). Paramyxovirus M Proteins: pulling it all together and taking it on the road. In *The Paramyxoviruses*. D. W. Kingsbury (Ed.). New York & London: Plenum Press.
- Plachter, B., Nordin, M., Wirgart, B. Z., Mach, M., Stein, H., Grillner, L. & Jahn, G. (1992). The DNA-binding protein P52 of human cytomegalovirus reacts with monoclonal antibody CCH2 and associates with the nuclear membrane at late times after infection. *Virus Res* 24, 265-76.
- Radsak, K., Brucher, K. H., Britt, W., Shiou, H., Schneider, D. & Kollert, A. (1990). Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* 177, 515-22.
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., F., K. H., Eis-Hübinger, A. & Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch. Virol.* 120, 557-572.
- Radsak, K., Kern, H. F., Reis, B., Reschke, M., Mockenhaupt, T. & Eickmann, M. (1995). Human cytomegalovirus: Aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins. In *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms*, S. 295-312. H. Friedman & G. Barbanti-Brodano (Ed.). New York: Plenum Press.
- Radsak, K. D., Brucher, K. H. & Georgatos, S. D. (1991). Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus. *Eur J Cell Biol* 54, 299-304.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
- Ripalti, A., Boccuni, M. C., Campanini, F. & Landini, M. P. (1993). Strategie molecolari per l'analisi della funzione genica di citomegalovirus umano. *Minerva Biotec* 5, 1-9.
- Ripalti, A., Boccuni, M. C., Campanini, F. & Landini, M. P. (1995). Cytomegalovirus- mediated induction of antisense mRNA expression to UL44 inhibits virus replication in an astrocytoma cell line: identification of an essential gene. *J Virol* 69, 2047-57.

- Rixon, F. J. (1993). Structure and assembly of herpesviruses. *Semin Virol* 4, 135-144. Robertson, H. D. (1990). Escherichia coli ribonuclease III. *Methods Enzymol.* 181, 189- 202.
- Robson, L. & Gibson, W. (1989). Primate cytomegalovirus assembly protein: genome location and nucleotide sequence. *J. Virol.* 63, 669-79.
- Roby, C. & Gibson, W. (1986). Charakterization of phosphoproteins and proteins kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 59, 714-727.
- Roche, J. K., Scheung, K., Boldogh, I., Huang, E. S. & Land, D. J. (1981). Cytomegalovirus: Detection in human colonic and circulating mononuclear cells in association with gastrointestinal disease. *Int. J. Cancer* 27, 659-667.
- Roizman, B. (1993). The Family Herpesviridae. In *The Human Herpesviruses*, S. 1-9. B. Roizman, R. J. Whitley & C. Lopez (Ed.). New York: Raven Press.
- Rubin, R. H., Russel, P. S., Levin, M. & Cohen, C. (1979). Summary of a workshop on Cytomegaloviurs infetion during organ transplantation. *J. Infect. Dis.* 139, 728-734.
- Rüger, B., Klages, S., Walla, B., Albrecht, J., Fleckenstein, B., Tomlinson, P. & Barrel, B. (1987). Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 61, 446-453.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Ed., Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schmolke, S., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995a). Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J Virol* 69, 1071-8.
- Schmolke, S., Kern, H. F., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995b). The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J Virol* 69, 5959-68.
- Scholl, S., von Hintenstern, J., Borisch, B., Traupe, B., Bröker, M. & Jahn, G. (1988). Prokaryotic expression of immunogenic polypeptides of the large phosphoprotein (pp150) of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 69, 1195-1204.
- Severi, B., Landini, M. P., Cenacchi, G., Zini, N. & Maraldi, N. M. (1992). Human cytomegalovirus nuclear and cytoplasmic dense bodies. *Arch Virol* 123, 193-207.
- Severi, B., Landini, M. P., Cenacchi, G., Zini, N. & Maraldi, N. M. (1992). Human cytomegalovirus nuclear and cytoplasmic dense bodies. *Arch Virol* 123, 193-207.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W. & Helenius , A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136.
- Somogyi, T., Michelson, S. & Masse, M. J. (1990). Genomic location of a human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68). *Virology* 174, 276-85.
- Spaete, R. R., Gehrz, R. C. & Landini, M. P. (1994). Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* 75, 3287-308.
- Spearman, C. (1908). *Brit. J. Psychol.* 2, 227.

- Stamminger, T. & Fleckenstein, B. (1990). Immediate-early transcription regulation of human cytomegalovirus. In Cytomegaloviruses, S. 3-19. J. K. McDougall (Ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Taylor, H. P. & Cooper, N. R. (1990). The human cytomegalovirus receptor in fibroblasts is a 30-kilodalton membrane protein. *J. Virol.* 64, 2484-90.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 60, 163-78.
- Wagner, R. W. (1995). The state of the art in antisense research. *Nature Medicine* 1, 1116- 1118.
- Weiner, J. W. & Gibson, W. (1983). Phosphorylation, maturational processing and relatedness of strain Colburn matrix proteins. *Virology* 129, 155-169.
- Welch, A. R., Woods, A. S., McNally, L. M., Cotter, R. J. & Gibson, W. (1991). A herpesvirus maturational protease, assemblin: Identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 88, 10792-10796.
- Wills, J. W. & Craven, R. C. (1991). Form, function, and use of retroviral gag proteins [editorial]. *Aids* 5, 639-54.
- Winnacker, E. L. (1985). *Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie*.(Ed.). Weinheim: VCH.
- Wood, L. J., Baxter, M. K., Plafker, S. M. & Gibson, W. (1997). Human cytomegalovirus capsid assembly protein precursor (pUL80.5) interacts with itself and with the major capsid protein (pUL86) through two different domains. *J. Virol.* 71, 179-190.
- Zipeto, D., Baldanti, F., Percivalle, E., Gerna, G. & Milanesi, G. (1993). Identification of a human cytomegalovirus mutant in the pp150 matrix phosphoprotein gene with a growth- defective phenotype. *J Gen Virol* 74, 1645-8.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. F: Kern möchte ich für die Überlassung des Themas und seine enga-gierte Betreuung während des Studiums und der Promotion danken.

Frau Dr. Gabriele Hensel danke ich für die hervorragende Betreuung, für ihre stetige Diskussionsbereitschaft und die menschliche Unterstützung während Diplomarbeit und Pro-motion.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. K. Radsak für seine weitreichende Unterstützung und unermüdliche Bereitschaft zur hilfreichen Diskussion.

Ringrazio la Prof.ssa Maria Paula Landini e il Dott. Alessandro Ripalti, Istituto di Micro-biologia, Università degli studi di Bologna, per l accoglienza gentile nel loro laboratorio, per l assistenza scientifica eccezionale e per l amicizia dimostrata.

Besonderer Dank gilt auch Frau B. Agricola, Herrn V. Kramer und Herrn R. Rößer für ihre aus-gezeichnete technische Unterstützung in Labor und Fotolabor.

Ferner danke ich allen meinen Mitarbeitern für nützliche Diskussionen, methodische Hilfe und den Spaß im Labor. Neben den oben genannten und vielen anderen sind das: Gabi Brand, Chun Yan Chen, Commander Heidrun Dartsch, Ralf Kleene, Thomas Klöckl, Birgit Metzger, p, Diamanto Pommerehne, Katja Schmidt.

Nicht zuletzt danke ich U3/AA32 und U3/AA35 für die engagierte UL32 AS mRNA Expression.

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Amon, Aumüller, Beato, Bestgen, Braasch, Dötz, Drenckhahn, Fischer, Fruhsdorfer, Ganßauge, Golenhofen, Habermehl, Hartmann, Ihm, Kaffarnick, Kern, Kirchner, Koolmann, Körle, Lang, Lauer, Löffler, v. Löw, Lührmann, Mannherz, Müller, Petzholdt, Röhm, Schachtschabel, Schindler, Schulz, Seitz, Siegel, Unsicker, Wiegandt.
